

Vergleichende Untersuchung zur Validität neuer Verfahren der LSD- und Ethanolbestimmung in Körperflüssigkeiten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Silke Wölfel, geb. Petri
aus Reutlingen

Gießen 2000

Zentrum für Ökologie des Fachbereichs Humanmedizin
Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Justus-Liebig-Universität
Leitung: Prof. Dr. med. G. Weiler

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Schütz
Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Norbert Katz

Tag der Disputation: 11. Dezember 2001

Meinen lieben Eltern

Inhalt

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
1.1	EINLEITUNG.....	1
1.2	PROBLEMSTELLUNG.....	4
2	GEMEINSAMER MATERIAL- UND METHODENTEIL	6
2.1	MATERIAL	6
2.1.1	Probenmaterial und -lagerung.....	6
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	6
2.1.3	Geräte	7
2.1.3.1	GC/MS.....	7
2.1.3.2	BM Hitachi 902	7
2.1.3.3	Cobas Mira.....	7
2.2	METHODEN.....	8
2.2.1	Probenvorbereitung.....	8
2.2.1.1	Extraktionsverfahren.....	8
2.2.2	Gaschromatographie	8
2.2.2.1	Aufbau eines Gaschromatographen	10
2.2.2.2	Säulenmaterial	10
2.2.2.3	Detektoren.....	11
2.2.3	Headspace-Methode.....	11
2.2.4	Massenspektrometrie	13
2.2.4.1	Ionisationstechniken	14
2.2.4.2	Trenntechniken	15
2.2.5	ADH-Methode.....	15
2.2.6	CEDIA® DAU LSD	15
2.2.7	EMIT® DAU LSD	16
2.3	STATISTIK.....	16
2.3.1	Mittelwert und Standardabweichung	16
2.3.2	Variationskoeffizient.....	16
2.3.3	Korrelationskoeffizient	17
2.3.4	Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.....	17
3	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR VALIDITÄT NEUER VERFAHREN DER ETHANOLBESTIMMUNG IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN.....	20
3.1	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	20
3.1.1	Geschichtlicher Rückblick	20
3.1.2	Pharmakokinetik	21
3.1.2.1	Allgemeines	21

3.1.2.2	Resorption.....	21
3.1.2.3	Verteilung.....	22
3.1.2.4	Metabolisierung.....	22
3.1.2.5	Elimination.....	25
3.1.3	Pharmakodynamik.....	26
3.1.3.1	Rauschwirkung.....	26
3.1.3.2	Auswirkung chronischen Alkoholkonsums auf den Organismus.....	27
3.1.3.2.1	Leber.....	28
3.1.3.2.2	ZNS.....	28
3.1.3.2.2.1	Delirium tremens.....	29
3.1.3.2.2.2	Korsakow-Syndrom.....	29
3.1.3.2.2.3	Wernicke-Syndrom.....	29
3.1.3.2.2.4	Alkoholische Demenz.....	30
3.1.3.2.3	Peripheres Nervensystem.....	30
3.1.3.2.4	Herz.....	30
3.1.3.2.5	Blut/Knochenmark.....	31
3.1.3.2.6	Gastrointestinaltrakt.....	31
3.1.3.2.7	Pankreas.....	31
3.1.3.2.8	Alkoholembryopathie.....	32
3.1.3.3	Interaktion zwischen Alkohol und Arzneimitteln.....	32
3.1.4	Nachweismethoden.....	33
3.1.4.1	Das Widmark-Verfahren.....	33
3.1.4.2	Das Vidic-Verfahren.....	33
3.1.4.3	Das ADH-Verfahren.....	33
3.1.4.4	Die Gaschromatographie.....	34
3.2	ERGEBNISSE.....	34
3.2.1	Bestimmung der Präzision in der Serie.....	34
3.2.2	Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag.....	37
3.2.3	Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagenzien.....	39
3.2.4	Kreuzreaktivität anderer niedermolekularer Alkohole mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim.....	40
3.2.5	Vergleich verschiedener Methoden zur Ethanolbestimmung.....	41
3.2.5.1	Vergleich von GC und der ADH-Methode von Boehringer Mannheim.....	41
3.2.5.2	Vergleich von GC und der ADH-Methode von Syva Co./Behring.....	42
3.2.5.3	Vergleich der Methode von Boehringer Mannheim und Syva Co./Behring.....	42
3.3	DISKUSSION.....	44
3.3.1	Headspace-Gaschromatographie.....	44
3.3.2	Ethyl Alcohol Assay von Boehringer Mannheim.....	45
3.3.3	TD _x REA [®] Ethanol Assay von Abbott.....	46
3.3.4	ALC Ethyl Alcohol Assay von Du Pont De Nemours.....	48
3.3.5	EMIT [®] ETS [®] Plus Ethyl Alcohol Assay von Syva Co./Behring.....	48

4	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR VALIDITÄT NEUER VERFAHREN DER LSD-BESTIMMUNG IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN	50
4.1	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	50
4.1.1	Geschichtlicher Rückblick	50
4.1.2	Pharmakokinetik	51
4.1.2.1	Resorption	51
4.1.2.2	Metabolisierung	51
4.1.2.3	Elimination	52
4.1.3	Pharmakodynamik	53
4.1.3.1	Wirkungsmechanismus	53
4.1.3.2	Wirkung	53
4.1.3.3	Therapie der LSD-Intoxikation	55
4.1.4	Nachweisverfahren	56
4.1.4.1	Screeningmethoden	56
4.1.4.1.1	Immunoassays	56
4.1.4.2	Bestätigungsanalysen	57
4.1.4.2.1	HPLC	57
4.1.4.2.2	HPTLC	58
4.1.4.2.3	CE	59
4.1.4.2.4	GC/MS	60
4.1.4.2.5	Fluoreszenzdetektion	60
4.2	ERGEBNISSE	61
4.2.1	Bestimmung der Präzision in der Serie	61
4.2.2	Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag	62
4.2.3	Meßgenauigkeit in hohen und niedrigen Konzentrationsbereichen	63
4.2.4	Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagenzien	64
4.2.5	Kreuzreaktivität verschiedener Substanzen mit dem CEDIA [®] DAU LSD von Boehringer Mannheim	65
4.2.6	Vergleich der CEDIA [®] -Methode und der EMIT [®] -Methode	67
4.2.7	Stabilität von LSD unter verschiedenen Bedingungen	68
4.2.7.1	Einfluß der Lichtverhältnisse	68
4.2.7.2	Einfluß der Temperatur	69
4.2.7.3	Einfluß des Materials des Behältnisses	70
4.2.7.4	Einfluß der Silanisierung	71
4.3	DISKUSSION	72
4.3.1	Screeningmethoden	72
4.3.1.1	Nichtradioaktive Immunoassays	72
4.3.1.2	Radioimmunoassays	76
4.3.2	Bestätigungsanalysen	77
4.3.3	Präanalytik	80

5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	81
6	LITERATUR.....	I
7	ANHANG.....	XVII
7.1	ABBILDUNGEN	XVII
7.2	ABKÜRZUNGEN	XXIV

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Seit vielen Jahrhunderten nutzen Menschen psychotrope Substanzen zur Berauschung. Gründe für den Gebrauch von Rauschmitteln sind vielseitig. Von großer Bedeutung ist die Sehnsucht der Menschen nach Euphorie und die wenigstens vorübergehende Flucht vor Sorgen und Problemen des Alltags. Insbesondere bei jungen Menschen spielt beim Drogenkonsum auch der Wunsch, erwachsen zu wirken sowie die größere Akzeptanz in

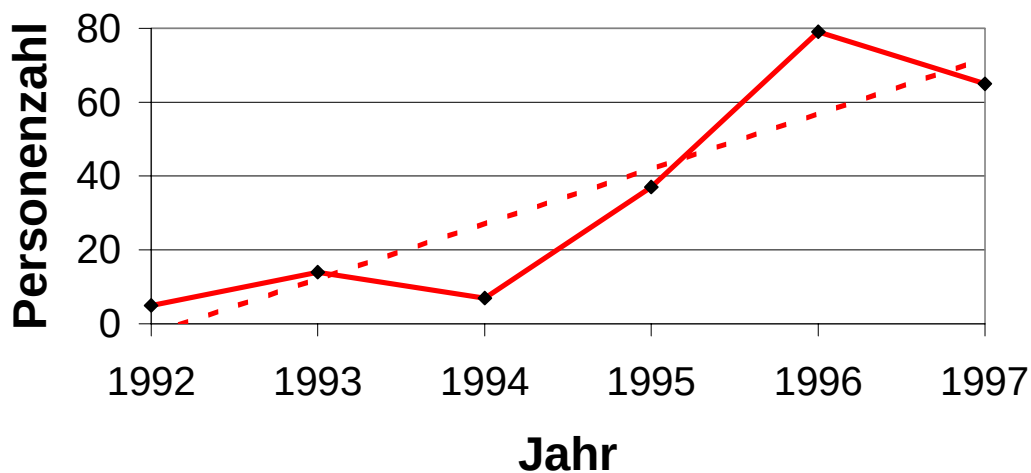


Abbildung 1

Anzahl der LSD-Konsumenten (durchgezogene Linie) im Zeitraum von 1992-1997 (gestrichelte Gerade entspricht der dazugehörigen Trendlinie)

(Quelle: Landeskriminalamt Wiesbaden)

Gruppen Gleichaltriger und letztendlich schlicht die Neugier auf das Unbekannte eine Rolle (Wanke, 1989). Die Drogen werden unterschieden in legale und illegale Drogen. Zu den legalen Drogen gehören Alkohol, Nikotin, Koffein und Medikamente. Bei den Medikamenten sind die Grenzen zwischen Legalität und Illegalität teilweise fließend, da z.B. Betäubungsmittel sowohl zurecht verordnet werden können als auch der unrechtmäßige Mißbrauch dieser Substanzen möglich ist. Zu den illegalen Drogen zählt man Ecstasy, Kokain, Crack, Cannabis (eine Ausnahme stellt das Dronabinol dar, eine stereoisomere Form des Delta-9-tetrahydrocannabinols, welches in den USA gegen

Erbrechen unter Zytostatikatherapie und bei AIDS-Patienten mit starkem Gewichtsverlust eingesetzt wird und mit diesen Indikationen auch in Deutschland neuerdings verordnungsfähig ist (Schütz, 1999)), Designerdrogen, Opium, Heroin, LSD und andere. Der Abusus beginnt in der Regel mit Zigaretten und Alkohol, dann folgen Haschisch und Marihuana, schließlich Kokain, Halluzinogene und Opiate (Young *et al.*, 1999). Drogen wie Marihuana, Haschisch, Heroin und LSD haben primär halluzinogene und betäubende Wirkungen, während andere Substanzen wie Amphetamine, Kokain und Ecstasy als "Muntermacher" gelten. Bei den in dieser Arbeit behandelten Substanzen ist der Ethylalkohol ein Beispiel für eine legale Rauschdroge, LSD ein Beispiel für eine illegale Droge. Der Gebrauch von legalen oder illegalen Drogen gehört nach wie vor zu einem der größten sozialmedizinischen Probleme (Meier, 1985). In unserer Gesellschaft ist Alkohol sehr weit verbreitet. Er ist eine sozial akzeptierte Genußdroge und wird von vielen Menschen regelmäßig konsumiert. Das Abhängigkeitspotential ist beträchtlich, doch wird aus bislang ungeklärten Gründen nur ein Teil der Menschen, die regelmäßig Alkohol zu sich nehmen, auch tatsächlich abhängig. Offensichtlich spielen verschiedene soziale, psychologische, aber auch körperliche Faktoren bei der Entwicklung einer Alkoholsucht zusammen. Während der Alkoholkonsum sich momentan auf einem gleichbleibenden Level eingependelt hat, ist bezüglich des LSD-Konsums in den letzten Jahren laut dem Jahrbuch Sucht 1998 ein erneuter Anstieg zu verzeichnen. Auch in München und Großbritannien durch Befragung von Personen erhobene Daten bestätigen dieses Ergebnis (Webb, Ashton und Kamali, 1996; Schuster *et al.*, 1998). Desweiteren stützen Angaben über die Prävalenz des LSD-Gebrauchs von 4% in Brüssel sowie Daten des Landeskriminalamtes Wiesbaden (vergleiche Abbildung 1) diese Aussage (Verstraete und Van de Velde, 1999).

Von Bedeutung ist auch die Tatsache, daß der LSD-Konsum, aber auch der regelmäßige Alkoholkonsum am häufigsten im Alter von 18-21 Jahren erfolgt. In diesem Alter erhalten die meisten jungen Menschen die Erlaubnis, ein Kraftfahrzeug zu führen. Hier kommen demnach gleich zwei Gefahrenmomente zusammen, einerseits mangelnde Fahrpraxis, andererseits die zusätzliche Gefährdung beim Führen eines Kraftfahrzeugs unter dem Einfluß von Rauschdrogen.

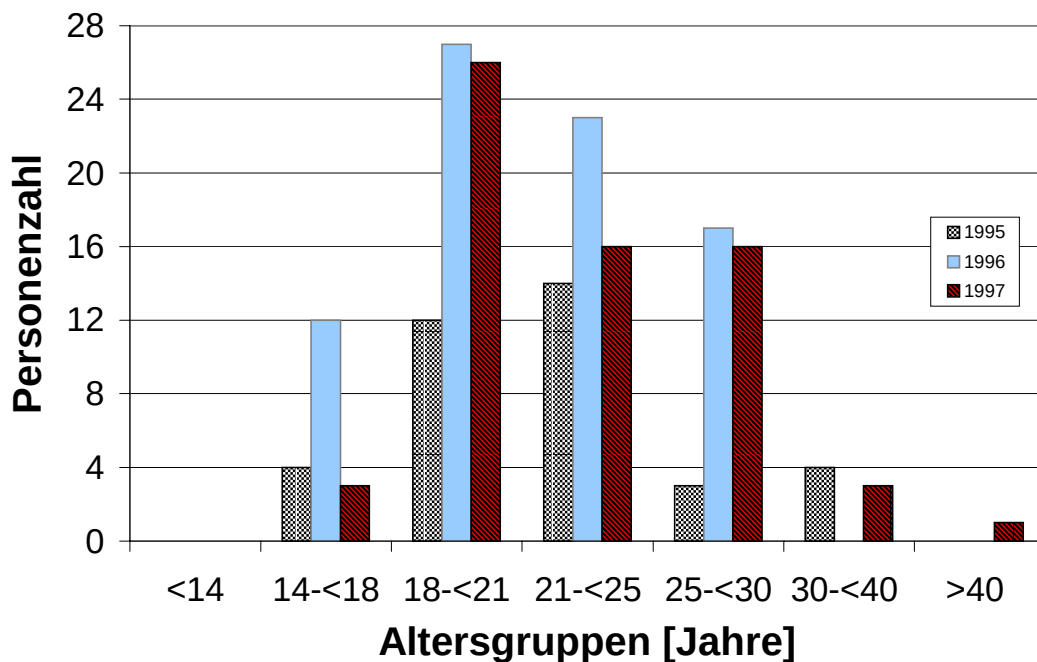


Abbildung 2

Altersverteilung der LSD-Konsumenten im Zeitraum von 1995-1997

(Quelle: Landeskriminalamt Wiesbaden)

Häufig werden auch mehrere Rauschmittel kombiniert eingesetzt, dieses kann unter anderem bei Suchtkranken mit der Absicht einer Wirkungsverstärkung erfolgen. Besonders problematisch sind Drogen, die starke euphorische Rausche verursachen und zu einer raschen Gewöhnung führen, da sie ein hohes psychisches und physisches Abhängigkeitspotential besitzen und leicht zur Sucht führen können. Ein weiteres Problem des Drogenabusus stellt die Intoxikation durch beabsichtigte oder unbeabsichtigte Beibringung einer Überdosis des Rauschmittels dar. Eine Besonderheit, die unter anderem durch überhöhte Dosierungen im Rahmen von LSD-Konsum auftreten kann ist die Möglichkeit des Vorkommens besonders bedrohlicher Halluzinationen, dem sogenannten Horror-Trip oder von realitätsverkennenden Halluzinationen (z.B. der irrtümlichen Annahme, fliegen zu können). In der Literatur sind einige Fälle beschrieben, bei denen die intoxikierten Personen unter dem Einfluß der Droge Gewaltverbrechen verübten, schwere Unfälle erlitten oder sich suizidierten (Williams, 1969; Ungerleider, 1970; Reich und Hepps, 1972; Klamt, 1973; Klepfisz und Racy, 1973; Trott, 1992). Da es sich bei LSD um eine farblose, geruchlose und

geschmacklose Substanz handelt, ist hier auch an die Möglichkeit der unbemerkten Beibringung durch Dritte zu denken (Schneider, 1983).

Starker Alkohol- oder Drogenrausch vertragen sich nicht mit der komplizierten Handhabung technischer Errungenschaften, z.B. von Autos, Maschinen etc. Aus diesem Grund ist beispielsweise das Führen eines Kraftfahrzeuges unter dem Einfluß von Alkohol und anderer Rauschdrogen strafbar. Die eingenommenen Rauschmittel müssen mit geeigneten Nachweismethoden bestimmt werden. Im Falle von unter dem Einfluß von Rauschmitteln verübten Delikten müssen diese so präzise sein, daß sie forensischen Beweisansprüchen genügen. Außerdem müssen sie eine große Empfindlichkeit aufweisen und mit möglichst geringem zeitlichen und technischen Aufwand durchführbar sein, um die Untersuchung großer Anzahlen von Proben zu ermöglichen. Bei Intoxikationen ist häufig aufgrund der möglicherweise lebensbedrohlichen Situation und der Notwendigkeit der Verabreichung eines geeigneten Antidots eine schnelle Identifikation der Substanz vonnöten, was unter Umständen große Schwierigkeiten bereiten kann. Screeninganalysen dienen hierbei als Suchkonzepte. Drogen- und Alkoholscreening gehören also nicht nur in die forensische Toxikologie sondern eigentlich in jedes Notfalllabor. Die Suche nach Optimierungsmöglichkeiten der Nachweismethoden für Alkohol und andere Drogen ist ständig im Fluß, so daß regelmäßig neue Testverfahren auf dem Markt erscheinen, die auf ihre Qualität überprüft werden müssen.

1.2 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden der CEDIA[®] DAU LSD und der Ethyl Alcohol Assay von Boehringer Mannheim hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit in der forensischen Toxikologie überprüft und mit anderen Verfahren sowie Daten aus der Literatur verglichen. Hierbei wurden die Untersuchungen zur Intrapräzision und Interpräzision sowie zur Spezifität der Methoden durchgeführt. Außerdem wurden die Dauer der Kalibrationsstabilität der Reagenzien für die Tests festgestellt. Schließlich wurden noch die Einflüsse unterschiedlicher Lagerungsbedingungen auf die Stabilität von LSD in LSD-haltigen Urinproben untersucht.

Bei den verschiedenen Analysenmethoden können unterschiedliche Probleme auftreten.

In dieser Arbeit von Bedeutung waren:

- Die Erfassung des Analyten in komplexer biologischer Matrix
- Der Analyse vorangehender erheblicher Metabolismus des Analyten
- Das Vorhandensein äußerst geringer Mengen des Analyten

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten aus der Literatur durch eigene Daten ergänzt, miteinander verglichen und im Zusammenhang kritisch bewertet. So konnten Aussagen über die Anwendbarkeit, Praktikabilität und Verlässlichkeit sowie die Empfindlichkeit der verschiedenen Verfahren getroffen werden.

2 Gemeinsamer Material- und Methodenteil

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial und- lagerung

Als Probenmaterial dienten Humanurin und Humanserum. Der Urin wurde, wenn nicht anders angegeben, unter Lichtabschluß und bei 4° C (im Kühlschrank) aufbewahrt.

Die Lagerung des Humanserums zur Bestimmung von Ethanol erfolgte in mit Gummistopfen verschlossenen Gläschen ebenfalls im Kühlschrank.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Die im experimentellen Teil verwendeten Chemikalien wiesen, wenn nicht anders angegeben, pro-analysi Qualität auf. Sie wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich und Riedel de Haen bezogen. Die verwendeten Reinsubstanzen zur Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Medikamente mit dem CEDIA[®] DAU LSD-Test von Boehringer Mannheim wurden der Referenzsammlung des Instituts entnommen. LSD und Nor-LSD wurde von Promochem bezogen. Die Testkits zur LSD- und Ethanolbestimmung auf dem BM Hitachi 902 sowie Zubehör stellte uns Boehringer Mannheim freundlicherweise zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung. Die Testkits für den EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay wurden von Syva Co./Behring bezogen.

2.1.3 Geräte

2.1.3.1 GC/MS

1. GC-System: HP 5890 II mit kontinuierlich heizbarem Ofen von Hewlett Packard, gekoppelt mit

MS-System: HP 5971A oder Hewlett Packard, Quadrupol-Gerät, Aufnahme-Bereich: 10-650 amu

2. GC-System: Perkin Elmer mit kontinuierlich heizbarem Ofen, gekoppelt mit Headspace-Injector HS 101 von Perkin Elmer, dem Integrator PE Nelson von Perkin Elmer sowie einem FID-Detektor

Software: HP-ChemStation, Version C.03.02; Massenspektrenbibliothek MS Drug Library, Rev. A.00.00 (Pfleger/Maurer/Weber)

GC-Säule: HP-Ultra 1-Kapillarsäule (Dimethylsilicon, 12 m x 0,2 mm i.D., 0,33 µm Filmdicke) von Hewlett Packard, 10 % Carbowax 1500 (60–80 mesh Carbopack, 2 m x 1/8 inch)

GC-Spritze: 10 µl von Hewlett Packard oder Analyt

2.1.3.2 BM Hitachi 902

Gerätekomponenten: Mehrfachanalysensystem mit integrierter Eingabeeinheit und Thermodrucker

Photometer: Konkav-Spektralgitterphotometer

Lichtquelle: Halogenlampe

Einheit: ng/ml (semiquantitativ), ΔE/ min

Wellenlängenbereich: 340-800 nm +/- 2 nm (nicht kontinuierlich)

Meßbereich: 0,0000-2500 Extinktionseinheiten

Meßtemperatur: 37°C +/- 1°C

Probenvolumen: 70 µl/ Test

Empfindlichkeit: 0,00005 Extinktionseinheiten

2.1.3.3 Cobas Mira

Gerätekomponenten: Mehrfachanalysensystem mit integrierter Eingabeeinheit und Thermodrucker

Einheit: ng/ml (semiquantitativ), ΔE/ min

Wellenlänge: 340 nm

Meßtemperatur: 37°C

Probenvolumen: 50-100 µl/ Test

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung

Trübe Seren und Urine wurden vor der Analyse abzentrifugiert, ansonsten erfolgte eine weitergehende Probenvorbereitung (Extraktion) lediglich für die GC/MS-Analysen bzw. in Form einer instrumentellen Probenvorbereitung bei der Headspace-GC (zehnmünütige Gleichgewichtseinstellung bei Thermostatisierung der Probe in einem Wasserbad von 80°C).

2.2.1.1 Extraktionsverfahren

Für die GC/MS-Analysen wurden die Urinproben wie folgt vorbereitet:

2 ml Urin werden mit NaOH auf einen pH von 9 gebracht und dann zwei mal mit Dichlormethan/Isopropanol 9:1 extrahiert. Das Extrakt wird bei 50°C unter Stickstoff abgedampft, dann mit 50 µl Essigsäureanhydrid und 20 µl Pyridin für 30 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach erneutem Abdampfen unter Stickstoff wird das Extrakt in 50 µl Essigsäureethylester rekonstituiert und aufgespritzt.

2.2.2 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie kann zur Trennung von Substanzgemischen, die verdampfbar sind, verwendet werden. Manche Substanzen eignen sich erst nach einer Derivatisierung zur Chromatographie. Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten und die hohe Empfindlichkeit haben die Gaschromatographie zu dem heutzutage am häufigsten eingesetzten Nachweisverfahren in der forensischen Toxikologie gemacht. Grundlage des gaschromatographischen Trennungsvorgangs ist die Einstellung eines Gleichgewichts der zu trennenden Komponenten zwischen der stationären Flüssigkeitsphase und der mobilen Gasphase. Dazu wird das Substanzgemisch zu einem bestimmten Zeitpunkt in die mobile Phase gegeben. Während das Substanzgemisch die Trennsäule durchläuft, treten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Komponenten des Gemischs und der stationären Phase auf, wobei diese Wechselwirkungen für die einzelnen Komponenten unterschiedlich sind. Auf diese Weise resultieren unterschiedliche Retentionszeiten für unterschiedliche Substanzen, die umso länger sind, je größer ihre Affinität zur stationären Phase und umso kürzer, je

geringer die Affinität zur stationären Phase ist. Substanzen mit geringer Affinität eluieren schnell mit scharfen Peaks, während Stoffe mit hoher Affinität erst spät mit breiten Peaks eluieren. Diese Gesetzmäßigkeiten bieten Schwierigkeiten, wenn im Substanzgemisch sowohl schnell als auch langsam eluierende Stoffe enthalten sind. Die Konsequenz wäre, daß zunächst einige scharfe Peaks zu Beginn des Chromatogramms eluieren würden, dann kämen einige Zeit überhaupt keine Peaks, und zum Schluß würden dann wieder einige breite Peaks auftauchen. Das wäre ungünstig, besonders in Bezug auf die Meßzeit und die Empfindlichkeit der Detektion. In der Gaschromatographie können daher druck- temperatur- oder flußprogrammierte Verfahren verwendet werden, um ein solches Chromatogramm zusammenzuschieben. Am häufigsten wird eine stetige Erhöhung der Arbeitstemperatur eingesetzt (Hübschmann, 1996; Schomburg, 1987). Die Aussagekraft gaschromatographischer Daten bei der Auswertung hängt wesentlich von dem verwendeten Detektor ab. Unspezifische Detektoren zeigen Substanzen zwar sehr empfindlich an, weisen aber Nachteile beim spezifischen Nachweis einer bestimmten Substanz auf. Massenselektive Detektoren können dagegen Substanzen auch in geringen Konzentrationen meist eindeutig identifizieren, dazu muß sich der Untersucher jedoch bereits vorher für eine bestimmte Substanzgruppe entscheiden. Eine hohe Spezifität kann hierbei nur erreicht werden, wenn in Kauf genommen wird, daß andere, ebenfalls im Untersuchungsgut enthaltene Substanzen nicht detektiert werden (zum Beispiel beim Selected Ion Monitoring; vergleiche Kapitel 2.2.4). Zur sicheren Identifikation muß allerdings außerdem die Retentionszeit der jeweiligen Substanz berücksichtigt werden. Eine Vergleichbarkeit der Retentionszeiten verschiedener Laboratorien kann in einem gewissen Rahmen mit der Bestimmung der Retentionsindices nach Kovats erreicht werden.

2.2.2.1 Aufbau eines Gaschromatographen

Ein Gaschromatograph besteht aus einer über ein Ventil geregelten Trägergasversorgung, einem Injektor mit Verdampfungssystem zur Probenaufgabe, einer durch einen Ofen kontinuierlich heizbaren Trennsäule, einem Detektor und einer Signalverarbeitungseinrichtung.

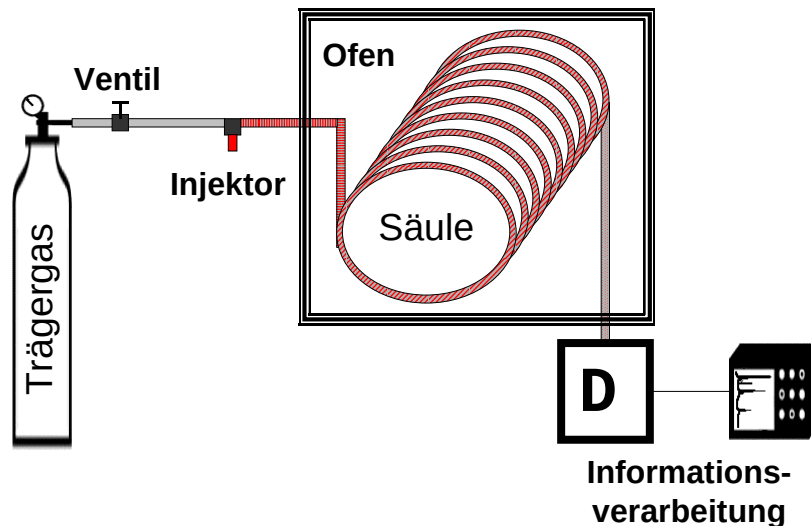


Abbildung 3

Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen (**D** = Detektor)

2.2.2.2 Säulenmaterial

Die Trennsäule ist das Kernstück des Gaschromatographen. Die äußere Hülle besteht aus einem Glas oder Metallrohr. Dieses Rohr ist im Inneren mit der jeweiligen stationären Phase beschichtet. Grundsätzlich sind Säulen verschiedenen Materials, verschiedener Größe und Form einsetzbar. Heutzutage häufig verwendete Säulen sind Fused Silica Säulen. Hierbei handelt es sich um lange, gewundene Kapillarsäulen aus amorph geschmolzenem Siliciumdioxid, die aufgrund ihres geringen Durchmessers wenig Platz benötigen und eine wesentlich bessere Trennleistung als herkömmliche Säulen erbringen (Hübschmann, 1996).

2.2.2.3 Detektoren

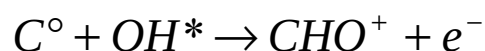
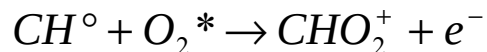
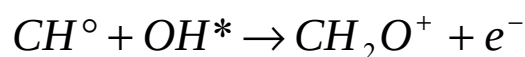
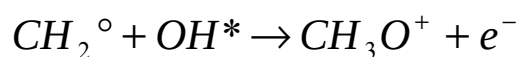
In der Gaschromatographie werden hauptsächlich massenselektive Detektoren (Vgl. Kap. 2.2.4) , Elektroneneinfangs- , Thermoionisations- und Flammenionisationsdetektoren eingesetzt.

Bei dem in dieser Arbeit zur Bestimmung von Ethanol in Serum verwendeten Flammenionisationsdetektor werden die Substanzen in einer Wasserstoffflamme verbrannt und dabei teilweise ionisiert. Solange lediglich Wasserstoff verbrannt wird, finden nur Radikalbildungen statt, die ohne Ionenbildung einhergehen. Kohlenstoffhaltige Verbindungen werden pyrolysiert und die entstehenden Radikale mit Sauerstoff und OH-Radikalen oxidiert.

Pyrolyse-Produkte: CH_3° , CH_2° , CH° , C°

Angeregte Radikale: O_2^* , OH^*

Ionisierung:



Positive Ionen werden an der negativen Düse neutralisiert und der korrespondierende Elektronenstrom wird registriert. Angezeigt werden nur Stoffe mit mindestens einer C-H oder C-C-Bindung. Die Vorteile eines Flammenionisationsdetektors sind seine hohe Dynamik und Empfindlichkeit, er findet einen breiten Einsatz bei organischen Verbindungen, ist aber bei der Detektion von Spuren in komplexer Matrix sowie bei hochchlorierten oder -bromierten Wasserstoffen nicht so gut geeignet (Hübschmann, 1996).

2.2.3 Headspace-Methode

Die Headspace-Methode eignet sich zur Analyse von flüchtigen Stoffen aus Flüssigkeiten oder Feststoffen. Ihr Vorteil liegt in einer besseren Empfindlichkeit der Meßmethode und in der, durch den Wegfall der organischen Matrix bedingten

Schonung der Säule. Sie hat sich daher insbesondere bei der gaschromatischen Ethanolbestimmung etabliert.

Bei dieser Methode wird die unbehandelte Probe in ein mit einem Gummiseptum verschlossenes Glasfläschchen gegeben und bis zur Gleichgewichtseinstellung in einem Wasserbad thermostatisiert. Hierbei ist die Konzentration des Stoffes in der Gasphase c_G abhängig von der Konzentration des Stoffes in der Probe c_S und dem Verteilungskoeffizienten k .

$$k = \frac{c_S}{c_G} \quad c_S = k \cdot c_G$$

Ist die Gleichgewichtseinstellung abgeschlossen, wird ein definierter Anteil der Headspace auf die Säule gegeben.

Im Chromatogramm ist die Peakfläche A proportional zur Konzentration des Stoffes in der Gasphase c_G , es gilt also:

$$A \cong c_G = \frac{1}{k} \cdot c_S$$

Da vom Gleichgewicht der Massen ausgegangen werden kann, ist es möglich, auf die Konzentration der Substanz in der ursprünglichen Probe rückzuschließen.

$$M_0 = M_S + M_G$$

Werden die Mengen M durch das jeweilige Produkt aus Konzentration c und Volumen V ersetzt, ergibt sich:

$$c_0 \cdot V_0 = c_S \cdot V_S + c_G \cdot V_G$$

Durch die Verwendung der ersten Gleichung kann die Unbekannte c_S durch $k \cdot c_G$

$$c_0 = c_G \cdot \frac{V_S}{V_0} \cdot \left(k + \frac{V_G}{V_S} \right)$$

ersetzt werden.

Für die Ausgangskonzentration ergibt sich mit $V_0=V_S$:

$$c_0 = c_G \cdot \left(k + \frac{V_G}{V_S} \right)$$

Da die Peakfläche A proportional zur Konzentration des Stoffes in der Gasphase c_G ist, gilt:

$$c_0 \cong A \cdot (k + \beta)$$

Dabei beschreibt β den Füllgrad des Behältnisses V_G/V_S und wird als Phasenverhältnis bezeichnet. Aus diesen Ausführungen läßt sich leicht ableiten, daß die ermittelte Peakfläche vom Verteilungskoeffizienten, dem Phasenverhältnis und dem Probenvolumen abhängig ist. Je größer allerdings der Verteilungskoeffizient ist, d.h., je weniger flüchtig der Stoff ist, desto weniger Einfluß hat das Probenvolumen auf die ermittelte Peakfläche (Hübschmann, 1996).

2.2.4 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie wird ein Substanzgemisch zunächst chromatographisch aufgetrennt und nachfolgend massenselektiv detektiert. Der massenselektive Detektor besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Auffänger. Die Ionenquelle entspricht einem im Hochvakuum befindlichen Bereich; an ihr werden die aus der Trennsäule des Gaschromatographen kommenden Moleküle ionisiert. Der Analysator trennt die eintreffenden Ionen nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) auf und der Auffänger registriert schließlich die Ionen. Die Detektion erfolgt heutzutage mit Elektronenmultipliern. Die erhaltenen Daten werden auf einen Computer übertragen und mit geeigneter Software ausgewertet. Die Summe aller auf den Multiplier gelangenden Ionen können als Totalionenstrom (TIC) aufgezeichnet werden, aus dem auch das Gaschromatogramm rekonstruiert werden kann. Bei der Massenspektrometrie können unterschiedliche Meßtechniken angewendet werden. Eine Möglichkeit ist die Detektion der vollständigen Spektren (Full Scan). Dabei wird in einem vorgegebenen Massenbereich für jede Masse die Ionenintensität aufgezeichnet und gegen das m/z -

Verhältnis der Ionen aufgetragen. Hierbei ergibt sich das jeweilige Chromatogramm. Die Identifikation der enthaltenen Substanzen erfolgt durch einen Vergleich der gefundenen Massenspektren mit einer Referenzbibliothek unter Berücksichtigung der Retentionszeit und dem Retentionsindex der gesuchten Substanz. Will man lediglich auf eine bestimmte Substanz untersuchen, deren Massenspektrum bereits bekannt ist, bietet sich die Detektion mit dem Selected Ion Monitoring (SIM) an. Der Ionenstrom wird bei diesem Detektionsmodus nur nach bestimmten charakteristischen Massen durchsucht. Dadurch, daß die gesamte Meßzeit nun zum Aufzeichnen weniger Massen zur Verfügung steht, wird die Nachweisempfindlichkeit deutlich erhöht. Der Unterschied massenselektiver Detektoren zu unspezifischeren Detektoren ist, daß die Substanzen meist eindeutig identifiziert werden können. Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden in der Regel mit weichen Ionisationstechniken GC-Peaks ionisiert. Aus dem entstandenen Gemisch wird ein Vorläufer-Ion durch eine erste massenselektive Auftrennung selektiert und dieses in einem weiteren Arbeitsschritt zu Tochter-Ionen fragmentiert. Nach einer erneuten massenspektroskopischen Auftrennung wird das Tochter-Ionen-Spektrum schließlich detektiert. Die Tandem-Massenspektrometrie wird eingesetzt, wenn aufgrund einer komplexen Probenmatrix das chemische Rauschen die Erfassung einer Substanz unmöglich macht und gleichzeitig eine Quantifizierung mit höchster Empfindlichkeit notwendig ist (Hübschmann, 1996).

2.2.4.1 Ionisationstechniken

Die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommene Ionisationstechnik ist die weit verbreitete Technik der Elektronenstoßionisation (electron impact). Die Moleküle werden hierbei mit von einem glühenden Heizdraht ausgesandten Elektronenstrahl (Ionisierungsenergie: 70 eV) beschossen. Es entstehen positive Molekül-Ionen und freie Elektronen. Durch die veränderte Ladung kommt es zu Konformationsänderungen, die Umlagerungen und Fragmentierungen des Moleküls bewirken. Diese Prozesse liefern für bestimmte Substanzen charakteristische Fragmente. Weitere Ionisationstechniken sind Chemische Ionisation, Feldionisation, Funkenionisation, Thermische Ionisation, Laser Mikroprobe Resonanz Ionisation, Ionisation durch induktiv gekoppeltes Plasma, Thermospray Ionisation, Particle Beam Ionisation, Oberflächenionisation, Feldresorption, Fast Atom Bombardment, Plasma Desorption und Laser Desorption (Hübschmann, 1996).

2.2.4.2 Trenntechniken

Die Auftrennung beginnt mit der Beschleunigung der gebildeten Ionen auf eine Ausgangsgeschwindigkeit durch das Anlegen einer Spannung und Bündelung zu einem Ionenstrahl mit Hilfe elektrostatischer Felder. Der Trennvorgang der bewegten, geladenen Teilchen kann auf verschiedene Weise erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Quadrupol-Massenspektrometrie angewendet. Bei diesem Verfahren wird der Ionenstrahl durch vier abgerundete, konzentrisch angeordnete Stabelektroden geleitet. Durch das innerhalb der Elektroden herrschende Hochfrequenzfeld werden die Molekülfragmente zum Schwingen gebracht. Nur Ionenfragmente einer bestimmten Masse können bei der jeweiligen angelegten Gleich- und Wechselspannung die Elektroden passieren und in den Auffänger gelangen, die übrigen Ionenfragmente werden aus dem System eliminiert. Durch Änderung der Werte für Gleich- und Wechselspannung können die Fragmente also nach ihren Massen aufgetrennt werden. Weitere Geräte-Typen mit unterschiedlichen Trenntechniken sind das Flugzeitmassenspektrometer, das Sektorfeldgerät, das Fourier-Transform-Massenspektrometer und der Ion-Trap-Detektor (Hübschmann, 1996).

2.2.5 ADH-Methode

Die ADH-Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion:



Das gebildete $\text{NADH} + \text{H}^+$ führt zu einer Extinktionsänderung bei 340 nm, welche der in der Probe enthaltenen Ethanolkonzentration proportional ist.

2.2.6 CEDIA® DAU LSD

CEDIA bedeutet Cloned Enzyme Donor Immunoassay. Der Test beruht auf der Anwendung der rekombinanten DNA-Technik, mittels der β -Galaktosidase in zwei inaktive Enzymfragmente gespalten wird. An eines der beiden Fragmente ist LSD konjugiert. Dieses konkurriert mit dem möglicherweise in der Probe enthaltenem LSD um Bindungsstellen an Antikörpern. Ist LSD in der Probe enthalten, so bindet es die Antikörper, woraufhin die beiden Enzymfragmente spontan zum aktiven Enzym rekombinieren. Das aktive Enzym spaltet ein Substrat und bewirkt hierdurch eine

Farbänderung, was im Test durch eine spektralphotometrische Messung erfaßt wird. Dabei ist die Menge des gespaltenen Substrats der LSD-Menge in der Probe proportional. Befindet sich jedoch kein LSD in der Probe, so wird eine Rekombination der Enzymfragmente durch Bindung der Antikörper an das mit dem Enzymfragment konjugierte LSD sterisch verhindert, so daß kein aktives Enzym entsteht und daher keine Umsetzung des Substrats erfolgt (Henderson, 1986).

2.2.7 EMIT[®] DAU LSD

Bei dem EMIT[®]-Prinzip (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) wird die Probe mit Konjugat gemischt. Enthält die Probe LSD, so konkurriert dieses mit dem Konjugat um den nun zugesetzten Antikörper. Die Bindung des Antikörpers an das Konjugat verhindert dessen enzymatische Aktivität, so daß bei Zugabe des Substrats kaum eine Umsetzung unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ stattfindet. Befindet sich allerdings LSD in der Probe so bindet es, abhängig von seiner Konzentration eine bestimmte Menge der Antikörper. Das freie, enzymatisch aktive Konjugat setzt nun eine entsprechende Menge Substrat um, wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet wird, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird und proportional zu der LSD-Menge in der Probe ist (Informationsbroschüre der Syva Co./Behring).

2.3 Statistik

2.3.1 Mittelwert und Standardabweichung

Zur Darstellung der Ergebnisse wird der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben, wann immer im Text vom „Durchschnitt“ oder dem „Mittel“ die Rede ist, ist der arithmetische Mittelwert gemeint, andere Lokalisationsmaße werden nicht verwendet.

Als weitere Kenngrößen dienen Wertmaxima und –minima.

2.3.2 Variationskoeffizient

Zur Beschreibung des Meßfehlers bei der Ermittlung der Präzisionsdaten findet außer der Standardabweichung der Variationskoeffizient als weiteres Streuungsmaß Verwendung. Der Variationskoeffizient gibt an, wieviel % vom arithmetischen Mittel die Standardabweichung beträgt und hat den Vorteil daß er von der gewählten Einheit unabhängig ist.

2.3.3 Korrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Enge des linearen statistischen Zusammenhangs zweier Merkmale. In dieser Arbeit wird er zur Veranschaulichung der Übereinstimmung beim Vergleich verschiedener Systeme zur Bestimmung von Ethanol in Körperflüssigkeiten verwendet.

2.3.4 Wilcoxon-Test für Paardifferenzen

Die statistische Auswertung der Experimente zur Lagerung von LSD erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Bei diesem Rangsummentest handelt es sich um einen parameterfreien Test, das heißt es werden keine normalverteilten Meßwerte vorausgesetzt. Um einen Anhalt dafür zu bekommen, wie die Meßwerte des CEDIA[®] DAU LSD verteilt sein könnten, wurden die Meßwerte einer Meßreihe (n= 24) in sieben gleich große Gruppen (Meßwertbereiche) aufgeteilt und die Anzahl der in die verschiedenen Gruppen gehörenden Meßwerte ermittelt. Dabei zeigte sich, daß die Verteilungsfunktion die Kriterien für eine Normalverteilung

- Eingipfligkeit
- Symmetrie
- Asymptotische Annäherung an die X-Achse

nicht erfüllt (vergleiche Abbildung 4).

Eine gleichartig gewonnene Darstellung der Meßwerte (n=35) der enzymatischen ADH-Methode zeigt annähernd eine Gaussche Normalverteilung (vergleiche Abbildung 5). Hieraus läßt sich ableiten, daß die unterschiedlichen Verteilungsfunktionen möglicherweise durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden bedingt werden (Enzymatische Methode versus Immunoassay).

Weitere in dieser Arbeit nicht praktisch angewendete Verfahren werden jeweils im theoretischen Teil beschrieben.

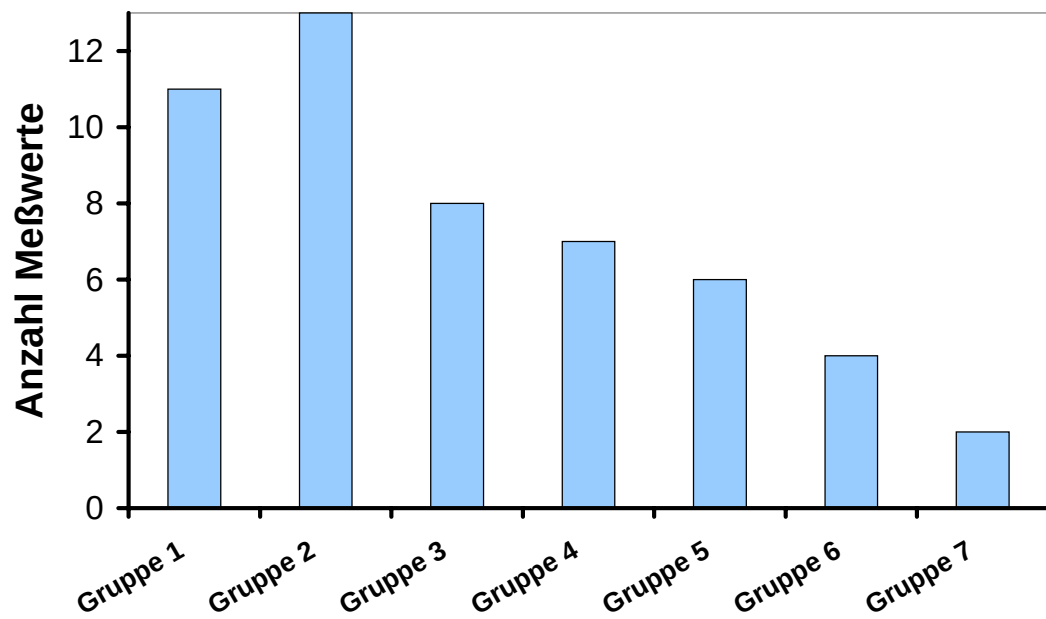


Abbildung 4

Linksschiefe Verteilungsfunktion von mit der CEDIA[®] DAU LSD-Methode gewonnenen Meßwerten.

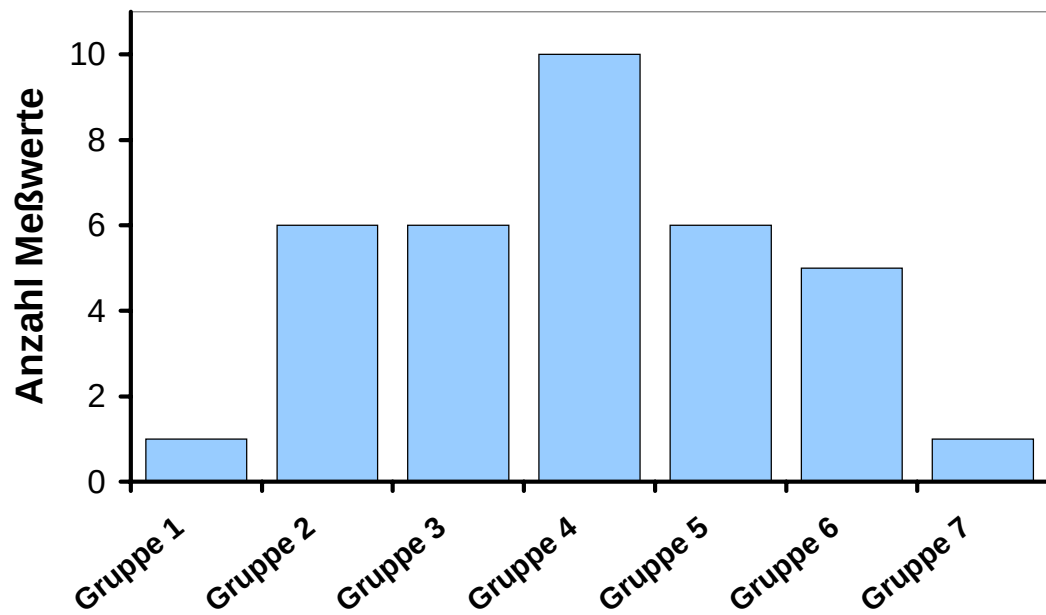


Abbildung 5

Annähernde Normalverteilung von mit der ADH-Methode gewonnenen Meßwerten

3 Vergleichende Untersuchung zur Validität neuer Verfahren der Ethanolbestimmung in Körperflüssigkeiten

3.1 Theoretische Grundlagen

3.1.1 Geschichtlicher Rückblick

Ethanol als Therapeutikum sowie Rausch- und Genußmittel war bereits –wie aus alten Schriftstücken überliefert ist- in früheren Kulturen bekannt. Zu dieser Zeit war die Gewinnung nur durch Gärung aus Honigwasser, Getreide oder Fruchtsäften möglich, während im 11. Jahrhundert die Herstellung eines potenteren Rauschmittels durch Destillation möglich wurde. Das Zeitalter der Industrialisierung bewirkte eine Entwurzelung bestimmter Bevölkerungsschichten, die sich aufgrund der Landflucht nicht mehr traditionell ernähren konnte. Die gleichzeitige Einführung der Kartoffel nach Europa führte bei diesem Teil der Bevölkerung zu Problemen. Überall entstanden Kartoffelbrennereien, die den Bauern einen erwünschten Nebenverdienst einbrachten. Der dadurch billig gewordene Schnaps galt als wesentliches Grundnahrungsmittel und wurde dementsprechend zugeführt. Der Alkoholkonsum wurde bis in das späte 18. Jahrhundert nicht als gesundheitsschädlich angesehen. Erst 1819 wurde der Begriff der Trunksucht geschaffen und die Problematik des Alkoholismus erkannt. (Keller, 1979; Stettler, 1990).

Liebig nahm bereits an, daß Alkohol im Körper über Aldehyd, Lactat, Oxalat und Formiat zu Kohlensäure metabolisiert würde. Die Elimination von Ethanol durch Metabolisation wurde aber für unwahrscheinlich gehalten, als man fand, daß Ethanol unverändert über Urin und Atemluft ausgeschieden wurde (Jacobsen, 1952).

Um 1870 begann die erste moderne Periode der Alkoholforschung; Wissenschaftler unterschiedlicher Nationalität wiesen unabhängig voneinander nach, daß die mit dem Urin und der Atemluft ausgeschiedene Alkoholmenge nur einem Bruchteil der zugeführten Alkoholmenge entsprach. Die wichtigste Erkenntnis bis 1900 war, daß Alkohol einen energiereichen Nährstoff für den Menschen darstellte. 1922 etablierte Widmark seine bis heute noch angewendete, quantitative Methode zur Bestimmung von Ethanol: das Widmark-Verfahren (Mallach, 1987).

3.1.2 Pharmakokinetik

3.1.2.1 Allgemeines

Das Verständnis der Pharmakokinetik des Ethanol ist wichtig, wenn es um Rückrechnungen von Blutalkoholkonzentrationen geht. Der Konzentrationsverlauf des Ethanol im Blut wird durch Invasion, Fließgleichgewicht und Elimination bestimmt. Invasion und Elimination laufen zeitweise gleichzeitig ab, so daß das Absinken der Alkoholblutspiegelkurve zu Beginn als ein Überwiegen der Elimination gegenüber der Invasion (nicht unbedingt als reiner Eliminationsprozeß) gedeutet werden kann. Der Verlauf der Blutalkoholkurve wird von der Alkoholkonzentration des jeweiligen Getränks, der Aufnahmefrequenz und gleichzeitiger Nahrungsaufnahme beeinflusst (Schütz, 1983). Größere Blutverluste, schwere körperliche Arbeit, Erbrechen und mäßige Hyper- oder Hypothermie haben dagegen keinen Einfluß auf den Verlauf der BAK (Ditt, 1961; Ditt, 1963; Krauland *et al.*, 1965; Mallach, 1987).

3.1.2.2 Resorption

Für die Resorption des Ethylalkohols stehen keinerlei spezielle Transportmechanismen zur Verfügung. Die Aufnahme erfolgt per Diffusionem und beginnt praktisch bereits in der Mundhöhle. Sie setzt sich im gesamten Gastrointestinaltrakt fort, der größte Anteil wird jedoch im Dünndarm resorbiert (Crabb *et al.*, 1987). Die maximale Blutalkoholkonzentration hängt von der Alkoholmenge und der Geschwindigkeit, mit der sie zugeführt wird sowie von Nahrungszufuhr und anatomischen Besonderheiten (z.B. Magenresektion, Stenosen im Bereich des Gastrointestinaltrakts, Störungen in der Peristaltik) ab (Ditt, 1963; Etzler *et al.*, 1968; Brettel *et al.*, 1977; Schellmann *et al.*, 1979; Shultz *et al.*, 1980). Ein Teil der aufgenommenen Alkoholmenge erscheint nicht im Blut. Der Verlust kann bis zu 36,8% betragen (Achinger und Mallach, 1973, Brettel *et al.*, 1977; Schmidt und Oehmichen, 1984)) Mit Bestimmtheit kann man sagen, daß dieses Resorptionsdefizit umso größer ausfällt, je langsamer die Resorption vonstatten geht.

Zur Erklärung der Ursachen gibt es mehrere theoretische Ansätze:

- Adsorption des Ethanols an Nahrungsbestandteile/Darmwand
- First-Pass-Metabolismus
- Chemische Veränderung, (Veresterung/Glucuronidierung)
- Abbau durch ADH im Magen (Ammon *et al.*, 1996)
- Gleichzeitige Verabreichung bestimmter Medikamente

3.1.2.3 Verteilung

Der resorbierte Alkohol verteilt sich unterschiedlich gut in den verschiedenen Geweben: in der ersten Phase der Verteilung sind die höchsten Konzentrationen in den am stärksten vaskularisierten Geweben zu finden. In der zweiten Phase verteilt sich der Alkohol entsprechend seinen hydrophilen Eigenschaften (Crabb *et al.*, 1987).

Aus diesen Gegebenheiten ist leicht abzuleiten, daß sich bei Personen mit erhöhtem relativen Anteil an Fettgewebe (z.B. alte Menschen, Frauen) ein höherer Anteil des Alkohols in das vaskuläre Kompartiment verteilt und daher höhere Blutalkoholkonzentrationen resultieren. Die oben angeführten Gesetzmäßigkeiten werden durch das Verhältnis der Alkoholkonzentration im gesamten Organismus zu der Alkoholkonzentration im Blut beschrieben. Dieser Verteilungsfaktor „r“ liegt im allgemeinen für Frauen etwa bei 0,6 , für Männer bei 0,7 und spiegelt die anatomischen Unterschiede des männlichen und weiblichen Geschlechts wieder (Freudenberg und Mallach, 1966). Bei rascher Anflutung des Alkohols im Blut kann es durch das plötzliche Abdiffundieren in die Gewebe zu einem kurzfristigen, starken Abfall der Blutalkoholkonzentration- dem sogenannten Diffusionssturz- kommen (Mallach *et al.*, 1987).

3.1.2.4 Metabolisierung

Ethanol wird in der Leber über Acetaldehyd zu Acetat oxidiert und nach der Aktivierung zu Acetyl-CoA in den intermediären Stoffwechsel eingeschleust. Dort erfolgt der Abbau zu H₂O sowie CO₂, welches über die Lunge eliminiert wird. Der Alkoholabbau erfolgt praktisch linear, d.h., es wird in einer bestimmten Zeit immer nur eine konstante, von der Blutalkoholkonzentration unabhängige Menge abgebaut. Man kann bei mittleren Blutalkoholkonzentrationen näherungsweise von einer Reaktion nullter Ordnung sprechen, da es aufgrund der nur begrenzt zur Verfügung stehenden

NADH-Menge zu einem linearen Abfall der Ethanolkonzentration im Blut kommt. Ein konzentrationsabhängiger Abbau im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik kann daher nur bei geringen Blutalkoholkonzentrationen stattfinden (Crabb *et al.*, 1987). Der leicht exponentielle Verlauf bei sehr hohen Blutalkoholkonzentrationen hängt mit der unterschiedlichen Affinität von Ethanol zu den verschiedenen Enzymen, welche zur Metabolisierung des Substrats fähig sind zusammen. Die Umsetzung zu Acetaldehyd erfolgt im wesentlichen (80-90%) durch die Alkoholdehydrogenase, einem NADH-abhängigem, zinkhaltigem Enzym, das im Zytosol der Leberzelle sowie zu einem geringen Anteil in Gehirn, Herz, Nieren, Muskulatur und dem Gastrointestinaltrakt lokalisiert ist. Sowohl NADH- als auch Zink-Mangel wirken sich nachteilig auf die Aktivität des Enzyms aus. Pyrazol ist ein spezifischer Inhibitor der ADH. Die breite Substratspezifität bedingt die Fähigkeit der ADH, auch andere Alkohole (Methanol, Butanol, Propanol, Pentanol) umzusetzen. Die optimale Aktivität liegt bei niedrigen Ethanolkonzentrationen, d.h., bei einer K_M von 2 mM ist bei 0,5 ‰ bereits die maximale Abbaugeschwindigkeit erreicht. Heute sind mehr als 10 verschiedene Formen der ADH bekannt. Die genetische Determinierung findet über mindestens 5 verschiedene Genloci statt (ADH₁-ADH₅), welche die dimeren Untereinheiten α , β , γ , ρ , χ kodieren. Für die Untereinheit β gibt es 3 Allele (β_1 , β_2 , β_3), für die Untereinheit γ 2 Allele (γ_1 , γ_2). Dadurch kommt es zu einem genetischen Polymorphismus. Neben der normalen ADH gibt es eine sogenannte atypische ADH, deren Untereinheit mindestens ein β_2 -Monomer aufweist. Die beiden Isoenzyme kommen mit unterschiedlicher Häufigkeit in bestimmten Populationen vor und unterscheiden sich durch die Affinität zum Substrat, das pH-Optimum, ihre Primärstruktur und die Aktivität (Berger *et al.*, 1974). Während bei Kaukasiern die „normale“ ADH mit einem pH-Optimum von 10,5 überwiegt, ist bei den Asiaten hauptsächlich die ADH mit der atypischen Einheit β_2 vertreten. Diese hat eine wesentlich höhere spezifische Aktivität und ein pH-Optimum von 8,5, das fast im physiologischen Bereich liegt (Crabb *et al.*, 1987). Die ADH erreicht ihre volle Aktivität im menschlichen Organismus im Allgemeinen erst ab dem fünften Lebensjahr, was auch die große Empfindlichkeit von Säuglingen und Kleinkindern gegenüber Ethanol erklärt.

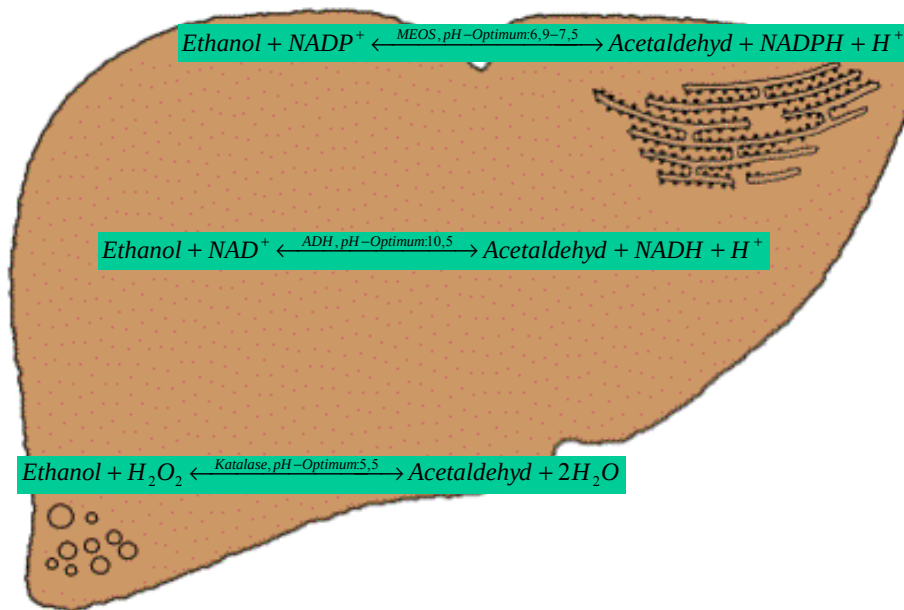


Abbildung 6

Abbauwege des Ethanols in der Leber im endoplasmatischen Retikulum (rechts oben), im Zytosol (Mitte) und den Peroxisomen (links unten)

10-20% des Ethanolabbaus kann durch ein weiteres ethanoloxidierendes System, dem im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle lokalisierten mikrosomalen ethanoloxidierenden System (MEOS) übernommen werden. Erste Hinweise, daß es noch ein zusätzliches, unabhängiges Enzym geben müsse, lieferte die Beobachtung, daß es bei mit Ethanol gefütterten Ratten zu einer Proliferation des endoplasmatischen Retikulums kam. Die Tatsache, daß auch nach Hemmung der ADH durch Pyrazol in Kaninchen ein weiterer Ethanolabbau stattfand, lieferte ebenfalls Hinweise hierauf (Fujimya *et al.*, 1989). Auch in biotischem Material aus menschlicher Leber konnte das MEOS im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden (Lieber und Decarli, 1970). Das MEOS benötigt die Anwesenheit der NADPH-abhängigen Cytochrom-c-Reduktase, Lecithin sowie Cytochrom P 450, und wird durch CO inhibiert. Die optimale Aktivität bei einer K_M von 10 mM liegt bei mittleren bis hohen Ethanolkonzentrationen, hierdurch erklärt sich auch der leicht exponentielle Verlauf der Blutalkoholkurve bei hohen Blutalkoholkonzentrationen. Das pH-Optimum des MEOS liegt im physiologischen Bereich (6,9-7,5). Im Gegensatz zur ADH ist die Aktivität des Systems bei Neugeborenen mit 75% bereits wesentlich höher (Kürzinger, 1981). Alkoholiker weisen meist gegenüber Menschen mit normalen Trinkgewohnheiten sowohl eine

höhere Toleranz gegen eine hohe Blutalkoholkonzentration als auch eine größere Abbaurate von Ethanol auf (Bönnichsen *et al.*, 1968). Eine Adaptation des MEOS kommt hierfür ursächlich in Frage (Lieber und Decarli, 1970; Onishi und Lieber, 1977). Ein weiteres zum Ethanolabbau fähiges, in der Peroxisomen der Leberzelle lokalisiertes Enzym ist das vom Cytochrom P-450 gesteuerte Hämprotein Katalase. Dieses Enzym hat ein pH-Optimum von 5,5 und kann durch Natriumazid gehemmt werden. Die Rolle der Katalase beim Ethanolstoffwechsel ist umstritten. Die Auffassungen reichen von der Ansicht, daß die Katalase bei der Ethanoloxidation in vivo praktisch keine Rolle spielt, da das zur Ethanoloxidation benötigte Wasserstoffperoxid in der Leber nur in ganz geringen Konzentrationen vorhanden ist (Teschke, 1985) bis zu einem Anteil am Ethanolabbau von 25 % (Moikeha *et al.*, 1972). Ebenfalls unterschiedlich sind die Angaben über die optimale Aktivität des Enzyms. Die K_M wird mit Werten von 0,6 mM bis zu 10 mM angegeben, man nimmt aber an, daß die Katalase ihre optimale Wirksamkeit - wenn überhaupt- bei mittleren bis höheren Ethanolkonzentrationen erreicht (Kürzinger, 1981). Das bei der Umsetzung des Ethanols durch die oben angeführten Enzymsysteme entstehende, toxische Acetaldehyd wird durch ein in den Mitochondrien der Leber lokalisiertes Enzym, der NADH-abhängigen Aldehyddehydrogenase zu Acetat abgebaut. Dieses Enzym existiert in zwei Varianten. Die an die mitochondriale Matrix gebundene Form ALDH₁ hat bei einer K_M von 0,001 mM eine sehr hohe Affinität zu Acetaldehyd, während die im Zytoplasma lokalisierte ALDH₂ mit einer demgegenüber 100-fach erhöhten K_M nur eine sehr geringe Affinität zu Acetaldehyd aufweist und bei dem Abbau von Acetaldehyd wahrscheinlich nur eine geringe Rolle spielt. Individuen, die mit diesem Isoenzym ausgestattet sind (Orientalen, Asiaten) leiden nach Alkoholgenuß unter dem akuten Aldehydsyndrom, welches sich in hauptsächlich in Übelkeit und Erbrechen, Flush, niedrigem Blutdruck und Kopfschmerz äußert (Mallach *et al.*, 1987). Eine Übersicht über diesen Themenkomplex bietet die 20. Mitteilung der deutschen Forschungsgemeinschaft für klinisch-toxikologische Analytik (Gibitz und Schütz, 1993).

3.1.2.5 Elimination

Die Elimination des Ethanols erfolgt zu 90-95% durch Metabolisierung in der Leber. Der Rest wird unverändert über die Niere, die Schweißsekretion, die Muttermilch und die Atemluft ausgeschieden (Oehmichen und Schmidt, 1984; Mallach *et al.*, 1987). Dabei kann ein statistisch signifikanter Unterschied des Ethanolabbaus zwischen

Männern und Frauen nicht gefunden werden (Kohlenberg-Müller und Bitsch, 1990). Die stündliche Oxidationsrate „ß“ kann sowohl inter- als auch intraindividuell sehr variabel sein, sie reicht von ca. $0,1^{0}/_{00}/h$ bis $0,24^{0}/_{00}/h$. Durchschnittlich nimmt man eine Abbaurrate von $0,15^{0}/_{00}/h$ an. Die Zufuhr von Glucose kann die stündliche Oxidationsrate steigern (Schmidt und Oehmichen, 1986). Minimale und maximale Abbauraten haben in der forensischen Toxikologie bei der Rückrechnung auf die Blutalkoholkonzentration zur Tatzeit Bedeutung (Schütz, 1983).

3.1.3 Pharmakodynamik

3.1.3.1 Rauschwirkung

Alkohol ist ein zentralnervös wirksames Narkotikum. Das Ausmaß der Beeinflussung durch Alkohol ist von endogenen und exogenen Faktoren abhängig. Unter endogenen Faktoren versteht man die unterschiedliche genetische Ausstattung der Individuen, z.B. mit Enzymen. Als exogene Faktoren sind Ernährungszustand, Alter, vegetative Ausgangslage, Gesundheitszustand, Ermüdung und Interaktionen mit anderen Substanzen zu nennen. Die Reaktion eines Individuums auf eine standardisierte Alkoholmenge kann daher sehr unterschiedlich ausfallen. Symptome, die sich nach Alkoholgenuß einstellen sind sämtlich auf eine mehr oder minder ausgeprägte Intoxikation zurückzuführen.

Stadien der Alkoholintoxikation

- $0-0,5^{0}/_{00}$: Veränderungen nicht auffällig, ab $0,3^{0}/_{00}$ allerdings bereits mit speziellen Methoden nachweisbare Leistungsminderung
- $0,5^{0}/_{00}-1,5^{0}/_{00}$: Leichte Trunkenheit (Schwips), Euphorie, Kritikschwäche, Nachlassen von kognitiven Fähigkeiten, Antriebssteigerung, Rededrang, leichte Gleichgewichtsstörung, Sehstörung, verlangsamte Pupillenreaktion, Nystagmus
- $1,5^{0}/_{00}-2,5^{0}/_{00}$: Mittlere Trunkenheit (Rausch), Symptome des Schwips verstärkt, zusätzlich Geh- und Sprachstörung, Distanzlosigkeit, Uneinsichtigkeit
- $2,5^{0}/_{00}-3^{0}/_{00}$: Schwere Trunkenheit (schwerer Rausch), Torkeln, Lallen, Orientierungsstörung, Amnesie

- über 3 ‰ : Schwerste Trunkenheit (schwerster Rausch) mit unmittelbarer Lebensgefahr, Somnolenz bis Bewußtlosigkeit, Reflexlosigkeit, Gefahr des Todes durch Atemlähmung, Unterkühlung oder die Folgen einer Aspiration

Besonderes Interesse gilt bei der Alkoholwirkung der Fahrsicherheit. Von einer strafbaren Alkoholbeeinflussung beim Führen eines Fahrzeugs ist dann die Rede, wenn die Blutalkoholkonzentration des Betroffenen die Grenzwerte (1,1 ‰) erreicht oder ein Gericht die relative Fahruntüchtigkeit (ab 0,3 ‰) feststellt (zusätzlich müssen dann weitere Beweisanzeichen vorhanden sein; Ahndung durch Entzug der Fahrerlaubnis, erhebliche Geldstrafe oder Freiheitsstrafe). Eine Ordnungswidrigkeit (wird mit Bußgeld und Punktbewertung geahndet) liegt vor, wenn der Betroffene eine Blutalkoholkonzentration zwischen 0,5 ‰ und 1,1 ‰ aufweist, ohne daß eine relative Fahruntüchtigkeit besteht. Wird der allgemeine Gefahrgrenzwert von 0,8 ‰ erreicht, wird zusätzlich zu Bußgeld und Punktbewertung ein Fahrverbot verhängt. Ab einer BAK von 1,6 ‰ wird die Fahrerlaubnis erst nach einer medizinisch-psychologischen Untersuchung (MPU) wieder erteilt. Insbesondere ist beim alkoholisierten Fahrer die aus der Antriebssteigerung bei gleichzeitiger Kritikschwäche resultierende Problematik hervorzuheben. Die Antriebssteigerung führt dazu, daß der Betroffene seine Fähigkeiten überschätzt. Die gleichzeitig bestehende Kritikschwäche macht es ihm aber unmöglich, seine Fehler zu erkennen. Ab einer Blutalkoholkonzentration von 2,5 ‰ ist eine Schuldunfähigkeit generell nicht ausschließbar. Dieses ist bei einer in diesem Zustand begangenen Straftat von Interesse. Da Rückrechnungen auf die Blutalkoholkonzentration zur Tatzeit allerdings meist ungenau sind, sollten außerdem Schlüsse über die Bewußtseinslage des Straftäters aus der Tat und den Begleitumständen gezogen werden (Schwerd, 1992).

3.1.3.2 Auswirkung chronischen Alkoholkonsums auf den Organismus

Der Metabolismus des Ethanol hat beim chronischen Alkoholkonsum toxische Effekte auf fast alle Organe.

3.1.3.2.1 Leber

Die alkoholischen Leberschäden umfassen Fettleber, Fettleberhepatitis, Leberfibrose und Leberzirrhose. Die Schädigung der Leber muß auf verschiedene Einflußgrößen zurückgeführt werden. Eine davon ist der vermehrte Anfall des toxischen Acetaldehyd. Die Ursache hierfür ist zunächst in dem nur begrenzt vorhandenen Coenzym NAD^+ der Aldehyddehydrogenase zu sehen. Das Acetaldehyd schädigt nun wiederum unmittelbar die Mitochondrien des Leberzellparenchyms, was den Abbau zu harmlosen Acetat noch weiter verzögert. Die toxische Einwirkung besteht so lange, wie die zugeführte Alkoholmenge die metabolische Kapazität übersteigt. Die Schädigung des Leberparenchyms auf diese Weise kann zu entzündlichen Veränderungen und nachfolgendem fibrotischen Umbau führen. Die Einlagerung von Triglyzeriden in das Leberparenchym wird durch einen Überschuß von Acetat sowie dem zur Synthese benötigten $\text{NADH}+\text{H}^+$ verursacht. Auch eine Anhäufung von Glycerin-1-Phosphat findet statt. Gleichzeitig werden Lipoproteine –wahrscheinlich infolge einer Störung der Synthese des Proteinanteils- vermindert an das Blut abgegeben, so daß Fette nicht aus der Leber wegtransportiert werden können. Mit resultierender zunehmender Fettspeicherung in der Leber (über 50% der betroffenen Zellen) entsteht eine Fettleber. Die Leberzirrhose ist das Ergebnis einer so starken und irreversiblen (unter Umständen über einen sehr langen Zeitraum erworbenen) Leberzellschädigung, daß mit dem fortschreitenden fibrotischen Umbau ein Verlust der Leberfunktion eintritt (Renger, 1981).

3.1.3.2.2 ZNS

Jeder weiß, daß Alkoholmißbrauch zu Leberschäden führt. Alkohol verursacht aber auch besonders starke Schäden im Gehirn, - stärker noch als andere Drogen. Chronischer Alkoholmißbrauch verändert nicht nur die Dichte von Bindungsstellen (Rezeptoren) für verschiedene Botenstoffe im Gehirn, sondern führt auch zum massiven Untergang von Gehirnzellen und damit zur schrittweisen Hirnatrophie, von der einige Regionen (zum Beispiel Kleinhirnwurm) stärker betroffen sind als andere. Die Ursachen für den Zelluntergang sind vielfältig. Die unmittelbar schädigende Wirkung des Alkohols auf die Nervenzellen beeinträchtigt die Funktion wichtiger Eiweißmoleküle im Gehirn. Außerdem tragen Fehlernährung bei chronischem Alkoholmißbrauch, Vitaminmangel, Verschiebungen des Säure-Basen- und

Salzhaushaltes in Blut und Gehirn zur Schädigung des Gehirns bei. Zunächst stellen sich unspezifische psychische Störungen ein (Konzentrationsstörungen, Interessenverlust, Unzuverlässigkeit, Abbau zwischenmenschlicher Beziehungen, mangelnde Urteilsfähigkeit, Persönlichkeitszerfall bis zu psychoorganischen Syndromen). Es folgen morphologische Symptome (Hirnatrophie, Lipofuszeinlagerung und Verdickung der weichen Hirnhäute). Letztlich kommt es zu charakteristischen Krankheitsbildern, von denen nachfolgend die wichtigsten besprochen werden.

3.1.3.2.2.1 *Delirium tremens*

Diese Erkrankung tritt häufig nach einer Abstinenz auf, kann aber auch Folge einer Erkrankung, einer Operation etc. sein. Reizbarkeit, Nervosität, Appetitlosigkeit und Schlaflosigkeit können als Prodromi vorausgehen. Die lebensbedrohliche Störung manifestiert sich mit vorwiegend optischen Halluzinationen, Tremor, Krämpfen und vegetativer Entgleisung. Das Ende des Deliriums ist meist durch einen langen Schlaf mit nachfolgendem Abklingen der Symptome gekennzeichnet (Poppe *et al.*, 1981).

3.1.3.2.2.2 *Korsakow-Syndrom*

Die Prodromi des Korsakow sind ähnlich denen des Delirium tremens; häufig geht sogar ein solches voraus. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Amnesie, Orientierungsstörungen sowie Konfabulationen bei einer jovialen, sorglosen Stimmung. Der körperliche Befund zeigt Kachexie, Schwäche, Leberinsuffizienz sowie die typische Polyneuritis der unteren Gliedmaßen. Die Störung kann sich zurückbilden oder einen organischen Hirnschaden (vorwiegend Veränderungen im Dienzephalon und an den corpora mamillaria) zurücklassen (Poppe *et al.*, 1981).

3.1.3.2.2.3 *Wernicke-Syndrom*

Es besteht eine enge Verbindung zum Korsakow-Syndrom. Der Beginn der Krankheit kann ähnlich verlaufen. Das klinische Bild zeigt den klassischen Symptomentrias: schwere Bewußtseinsstörung, Ophthalmoplegie und Ataxie. Diese Erkrankung kann sehr schwer verlaufen und innerhalb weniger Wochen zum Tod führen. Ein organisches Psychosyndrom bleibt als Residualzustand fast immer zurück. Die morphologischen Veränderungen finden sich im Bereich des Aquädukts, des Thalamus, des

Hypothalamus sowie des Hirnstamms in Form akuter Blutungsherde (Poppe *et al.*, 1981).

3.1.3.2.2.4 Alkoholische Demenz

Die oben genannten Erkrankungen führen zu diesem Endzustand, dem der chronische Abbau des Hirngewebes zugrunde liegt. Die Symptome sind Urteilsunfähigkeit, Triebhaftigkeit, sexuelle Enthemmung und soziale Unfähigkeit. Bei weiterer Intoxikation kommt es zu schweren neurologischen Störungen, Ausbildung unreifer Reflexe und schließlich zum Tod (Poppe *et al.*, 1981).

3.1.3.2.3 Peripheres Nervensystem

Die Beteiligung des peripheren Nervensystems äußert sich in von distal nach proximal fortschreitenden Polyneuritiden, die sich zunächst sensorisch, dann aber auch motorisch bemerkbar machen. Auch das vegetative Nervensystem wird angegriffen, Veränderungen des Vasalva-Manövers und des Schellong-Tests können beobachtet werden. Auch hier kommen ursächlich alimentäre Störungen und dadurch bedingter Vitaminmangel in Frage (Poppe *et al.*, 1981).

3.1.3.2.4 Herz

Mit Schäden am Herzen bei chronischem Alkoholabusus ist vornehmlich die Alkoholkardiomyopathie gemeint. Klinisch fallen die Patienten zunächst durch allgemeine Zeichen der Herzinsuffizienz sowie EKG-Veränderungen im QRS- und T-Bereich auf, später kommen tachykarde Rhythmusstörungen dazu, wobei sich die Symptome der Herzinsuffizienz weiter verschlechtern. Ein plötzlicher Herztod ohne vorausgehende Symptomatik ist ebenfalls möglich. Bei der Obduktion findet man schwere Veränderungen des Myokards (Hypertrophie, Ödem mit fettiger Degeneration, diffuse Narbendurchsetzung, maschendrahtartige Fibrose) bei weitgehend unauffälligen Koronarien. Eine Abgrenzung der Alkoholkardiomyopathie von der kongestiven Kardiomyopathie ist weder klinisch noch morphologisch möglich. Als Ursache für die Erkrankung kommen verschiedene Faktoren in Frage. Neben der genetischen Disposition werden kardiotoxische Effekte des Ethanolmetabolismus und eine entzündliche Veränderung der kleinen Gefäße bei unauffälligen Koronarien diskutiert. Eine durch den chronischen Alkoholkonsum bedingte Immunschwäche führt außerdem

möglicherweise zu einer erhöhten Anfälligkeit für Virusmyokarditiden (Müller und Pocher, 1981).

3.1.3.2.5 Blut/Knochenmark

Chronischer Alkoholkonsum beeinflusst das hämatopoetische System in vielfältiger Weise. Sowohl die Erythropoese als auch die Myelopoese und die Thrombopoese werden gestört. Dies äußert sich in durch Vitamin B₁₂- und Folsäuremangel erklärbaren Veränderungen (Megaloblastenanämie, Thrombopenie) sowie in durch Membranveränderungen der Zellen resultierenden Störungen und in alkoholischer Immunsuppression. Die Veränderungen führen klinisch zu Anämien, Blutungsneigung, erhöhte Infektanfälligkeit und insgesamt geringerer Leistungsfähigkeit (Stobbe, 1981).

3.1.3.2.6 Gastrointestinaltrakt

Als Veränderungen der Mundhöhle durch chronischen Alkoholkonsum werden Glossitis, Stomatitis und Papillentrophie beschrieben, die aber auch durch alimentäre Faktoren (Vitaminmangel) bedingt sein könnten. Für die ebenfalls beobachtete Häufung der Karzinome in diesem Bereich ist der Alkoholmißbrauch als Ursache jedoch sehr wahrscheinlich, zumal sie unabhängig von einem gleichzeitigen Nikotinabusus beobachtet wurde.

Bei den Veränderungen des Ösophagus sind neben durch Motilitätsstörungen und dem daraus resultierenden Reflux verursachte entzündliche Veränderungen das Mallory-Weiß-Syndrom sowie in Kombination mit Nikotin überproportional häufig auftretende Malignome zu nennen (Petzold, 1981). In Magen und Duodenum treten nach akutem oder chronischen Alkoholkonsum gehäuft Entzündungen auf, Erosionen mit zum Teil starken Blutungen nach akutem Genuß von Alkohol, insbesondere Hochprozentigem, sind möglich. In distalen Abschnitten des Dünndarms bewirkt Alkohol eine Passagebeschleunigung. Die Resorption von Vitaminen, Fetten und Xylose wird hierdurch vermindert.

3.1.3.2.7 Pankreas

Der Mehrzahl der Fälle in denen klinisch eine akute Pankreatitis imponiert, liegt tatsächlich eine durch langjährigen Alkoholmißbrauch verursachte chronische Pankreatitis zugrunde. Ursächlich kommen metabolisch-toxische Faktoren ebenso wie eine durch chronischen Ethanolkonsum induzierte Hyperfunktion der Azinuszelle mit

Sezernierung eines kalzium- und eiweißreichen Sekrets und resultierender Steinbildung in Betracht. Sowohl das akute Krankheitsgeschehen als auch Komplikationen der Pankreatitis (Pankreaspseudozyste, Behinderung des Gallenabflusses, pleuropulmonale Komplikationen) können zum Tod führen. Weitere Folgeerscheinungen sind die letztendliche exokrine und endokrine Pankreasinsuffizienz (Teichmann und Zastrow, 1981).

3.1.3.2.8 Alkoholembryopathie

Nicht nur das Gehirn von Erwachsenen wird durch Alkohol geschädigt. Schon ungeborenen Kindern werden durch Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft Gehirnschädigungen zugefügt. Die Beeinflussung des Embryos durch Ethanol führt zu einer leichten bis ausgeprägten Fruchtschädigung, der sogenannten Alkoholembryopathie I-III. Das Syndrom ist gekennzeichnet durch einen intrauterinen und postnatalen Wachstumsrückstand, Mikrozephalie und geistige Retardierung. Die typische Facies beinhaltet eine niedrige, gerundete Stirn, Ptosis, Epikanthus, kurzer Nasenrücken, flaches Philtrum, schmales Oberlippenrot, vertiefte Nasolabialfalten, tiefstehende Ohrmuscheln und Retrogenie. Die Diagnosestellung kann insbesondere bei den leichteren Fällen ohne Kenntnis der Alkoholanamnese schwierig sein, bei schwer betroffenen Kindern erkennt der erfahrene Kliniker die Erkrankung allerdings auf den ersten Blick (Holtorf und Hinkel, 1981).

3.1.3.3 Interaktion zwischen Alkohol und Arzneimitteln

Die Kombination von Alkohol und Arzneimitteln kann zu einer additiven, überadditiven und synergistischen Verstärkung entweder der Alkoholwirkung oder der Medikamentenwirkung führen. Gleichwohl ist jedoch auch eine unteradditive oder antagonisierende Wirkung bis zur Unwirksamkeit möglich. Dabei ist meist die Medikamentenwirkung betroffen. In Verbindung mit manchen Medikamenten (z.B. Tolbutamid, Metronidazol, Sulfonamid, Griseofulvin) kann es bei Ethanolgenuß zu einer Disulfiram-ähnlichen (ALDH-Blockade) Reaktion kommen (Fraser, 1997). Außerdem kann Alkohol eine Veränderung der Pharmakodynamik und/oder -kinetik der anderen Substanz bewirken. Als mit Ethanol interagierende Substanzen kommen unter anderem nichtsteroidale Antirheumatika, Analgetika vom Morphintyp, Antiepileptika, Antihistaminika, Antihypertonika, Antidiabetika, Hypnotika, Sedativa, Narkotika,

Lokalanästhetika, Muskelrelaxantien, Psychopharmaka, Steroide und Tuberkulostatika in Betracht (Klinger, 1981; Schütz, 1983; Weller, 1984).

3.1.4 Nachweismethoden

Der routinemäßige Nachweis von Ethanol in Körperflüssigkeiten für forensische Fragestellungen kann im wesentlichen durch drei Analysemethoden erfolgen. Die Ethanolkonzentrationen der Proben müssen in zwei voneinander unabhängigen Verfahren gemessen werden. Dabei muß die gaschromatographische Bestimmung mit mechanisierter Probenaufgabe und die Bestimmung nach der ADH-Methode jeweils zweifach erfolgen, für die gaschromatographische Bestimmung ohne mechanisierte Probenaufgabe oder das Widmark-Verfahren ist eine dreifache Untersuchung vonnöten. Die Meßwerte dürfen bei Konzentrationen unter 1g/l nicht mehr als 0,1g/l absolut, bei Konzentrationen über 1g/l nicht mehr als 10% des Meßwerts voneinander abweichen (Schütz, 1983).

3.1.4.1 Das Widmark-Verfahren

Bei diesem Verfahren werden die reduzierenden Eigenschaften des Ethanols ausgenutzt. Bei der Auswertung wird der Anteil des nicht-reduzierten Kaliumdichromats einer definierten, vorgegebenen Menge photometrisch bestimmt. Da auch zahlreiche andere Substanzen reduzierende Eigenschaften besitzen, handelt es sich naturgemäß um ein unspezifisches, weder alkohol- noch ethanolspezifisches Verfahren.

3.1.4.2 Das Vidic-Verfahren

Das Vidic-Verfahren ähnelt dem Widmark-Verfahren. Hierbei wird statt Kaliumdichromat Vanadiumdichromat reduziert.

3.1.4.3 Das ADH-Verfahren

Das oben beschriebene enzymatische Verfahren ist alkoholspezifisch und wenn auch nicht ethanolspezifisch, so haben doch Verbesserungen in den letzten Jahren eine weitgehend störungsarme Methode hervorgebracht. Dieses Verfahren ist Grundlage vieler Alkoholtests, die von unterschiedlichen Herstellern angeboten werden und auf die noch vergleichend in der Diskussion eingegangen wird. Eine Variation der ADH-Methode stellt die REA-Methode (Radiative Energy Attenuation) dar. Hierbei erfolgt nach der Umsetzung des Ethanols zu Acetaldehyd und $\text{NADH} + \text{H}^+$ ein weiterer Schritt, in dem $\text{NADH} + \text{H}^+$ und ein Chromogen zu NAD^+ und einem Chromophor umgesetzt

werden. Dem Reaktionsgemisch ist außerdem eine stabile fluoreszierende Substanz zugesetzt, ein Fluorophor. Je mehr Chromophor gebildet wird, desto mehr des entstehenden Fluoreszenzlichts wird durch dieses absorbiert. Die Abnahme der Strahlungsintensität wird mit einem Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay erfaßt und ist ein Maß für die in der Probe enthaltene Alkoholkonzentration (Caplan und Levine, 1986).

3.1.4.4 Die Gaschromatographie

Diese ist die spezifischste aller Nachweismethoden. Neben der Identifizierung von Ethanol ist der Nachweis anderer Alkohole und sogenannter Begleitstoffe möglich (Machata, 1967).

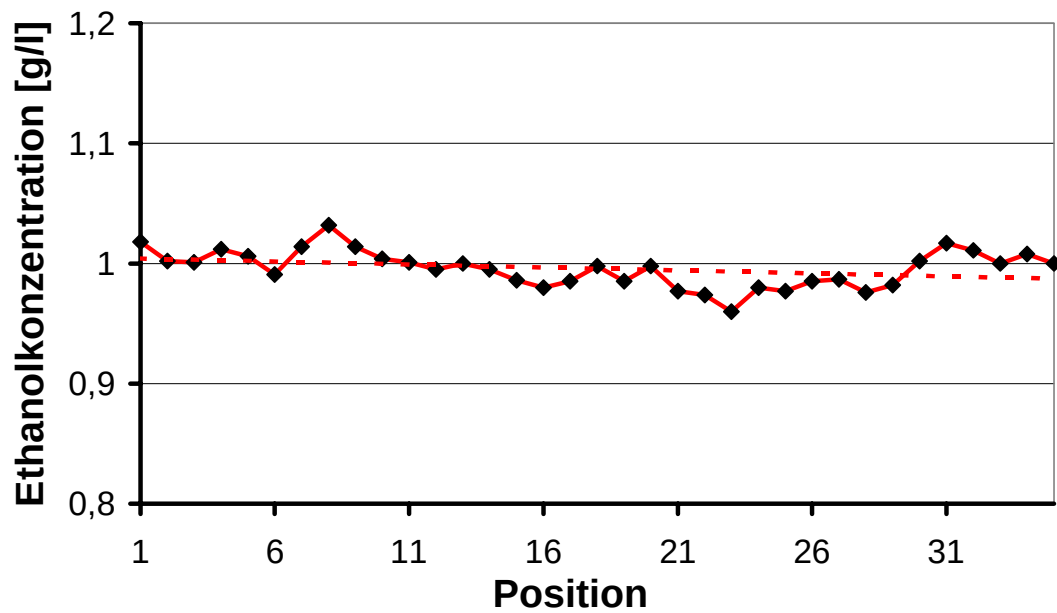
3.2 Ergebnisse

3.2.1 Bestimmung der Präzision in der Serie

Untersucht wurde die Präzision in der Serie auf dem BM Hitachi 902, einem offenen analytischen System.

Dazu wurden die 35 Plätze eines Probenellers komplett mit kommerziellen Kontrollen bestückt und deren Ethanolkonzentrationen in einer Analysenzeit von etwa 15 Minuten bestimmt. Diese Messung wurde einmal mit einer wäßrigen Ethanolkontrolle und einmal mit einer Serum-Ethanolkontrolle durchgeführt. Bei den Messungen der niedrigeren, wäßrigen Ethanolkontrolle ergab sich im Rahmen der Bestimmung der Präzision in der Serie ein Variationskoeffizient von 1,542% und ein Konzentrationsabfall über die Analysenzeit von 1,77%, für die hoch konzentrierte Serum-Ethanolkontrolle ein Variationskoeffizient von 0,728% und ein Konzentrationsabfall über die Zeit von 3,167%.

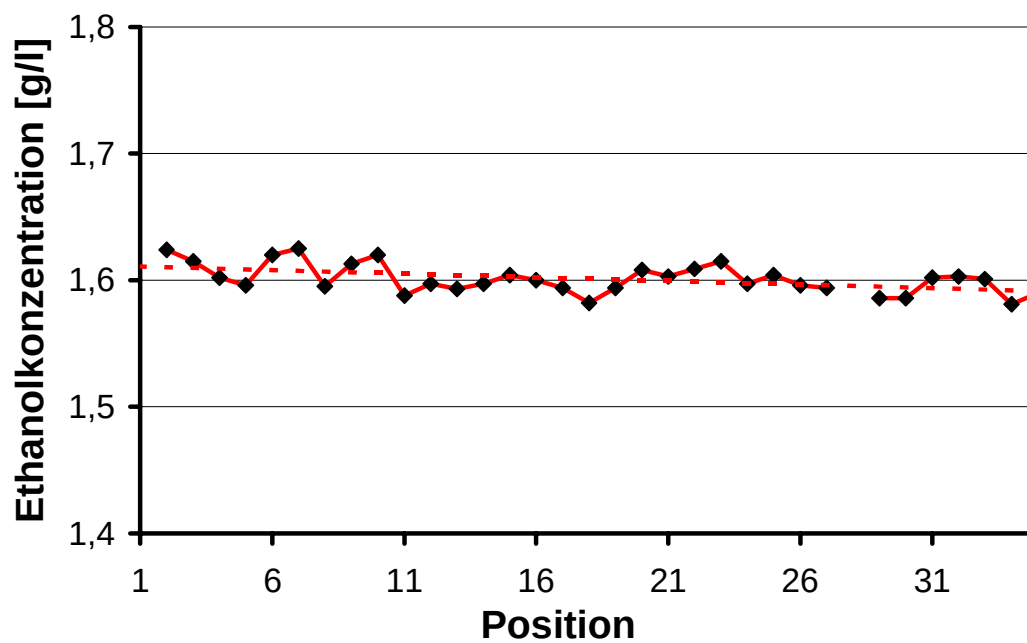
Für die ermittelten Formelgeraden der beiden Trendlinien ergab sich kein relevanter Unterschied in den Steigungen, sie waren beide leicht negativ (Wäßrige Ethanolkontrolle: $y = -0,0005x + 1,0049$; Serum-Ethanolkontrolle: $y = -0,0006x + 1,6116$). Die Meßwerte lagen allesamt innerhalb des für forensisch-toxikologische Bestimmungen geforderten Bereichs (vergleiche Abbildungen 7 und 8).



Mittelwert [g/l]	$X_{\max}$ [g/l]	$X_{\min}$ [g/l]	Standardabweichung [g/l]	Variationskoeffizient [%]
0,996	1,032	0,960	0,015	1,542

Abbildung 7

Bestimmung der Präzision in der Serie mittels einer wäßrigen Ethanolkontrolle (1g/l) (gestrichelte Gerade entspricht der Trendlinie)



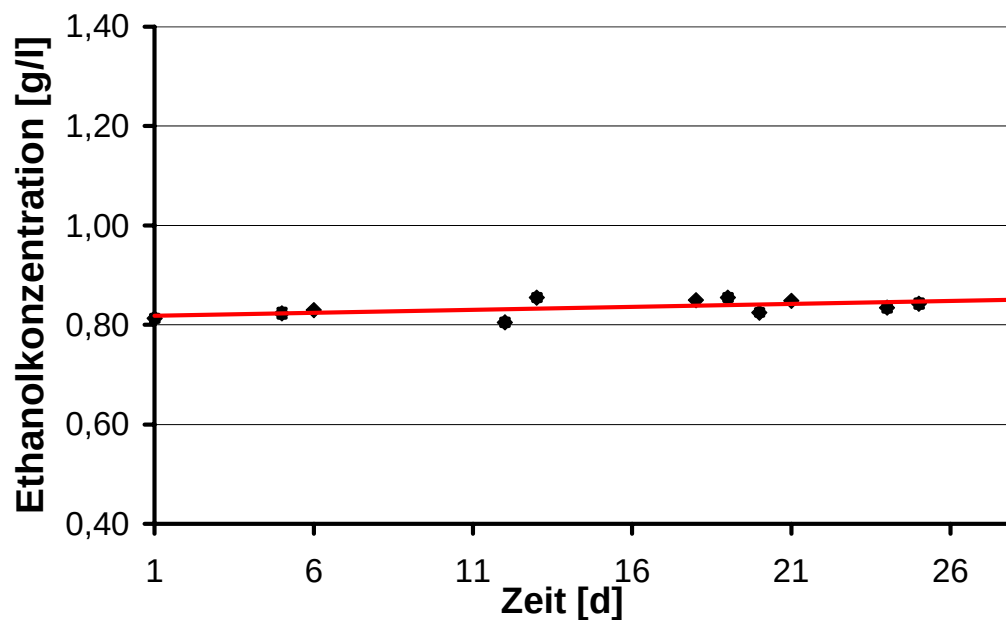
Mittelwert [g/l]	$X_{\max}$ [g/l]	$X_{\min}$ [g/l]	Standardabweichung [g/l]	Variationskoeffizient [%]
1,601	1,625	1,581	0,012	0,728

Abbildung 8

Bestimmung der Präzision in der Serie mittels einer Serum-Ethanol-Kontrolle (1.6 g/l) (gestrichelte Gerade entspricht der Trendlinie)

3.2.2 Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

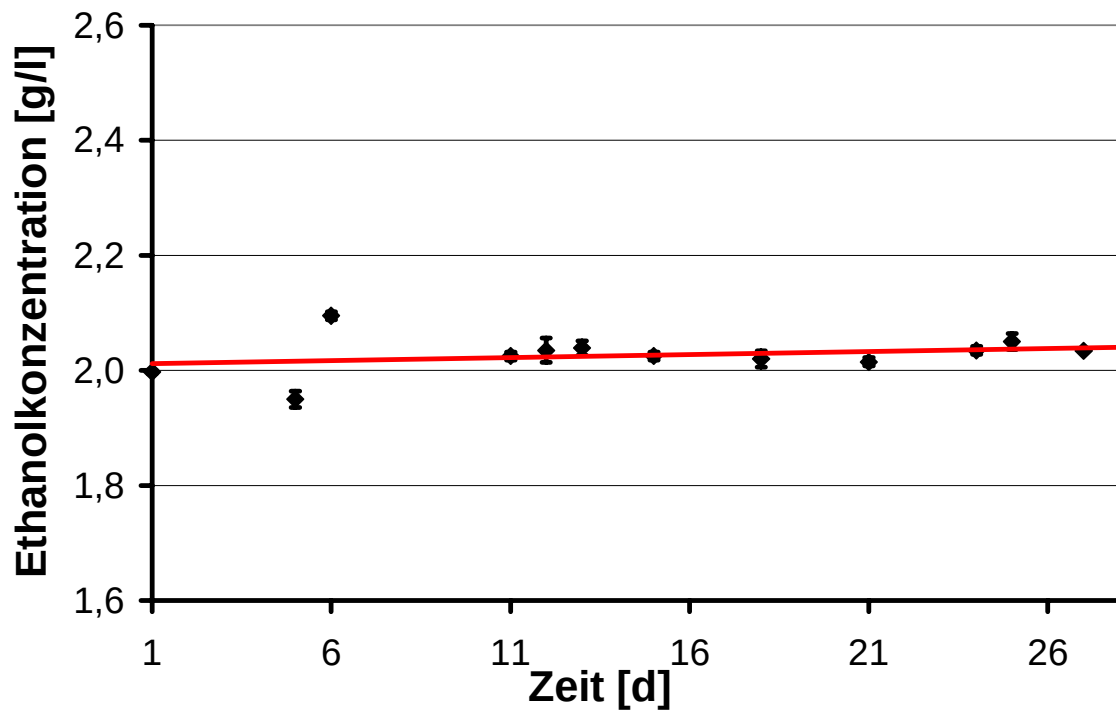
Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag auf dem BM Hitachi 902 erfolgte mittels einer über den Zeitraum von 28 Tagen fortlaufenden Messung (Doppelbestimmungen) einer höher konzentrierten und einer niedriger konzentrierten, wäßrigen Ethanolkontrolle. dabei wurde den Erfordernissen entsprechend, also nicht jeden Tag kalibriert. Für die höher konzentrierte Ethanolkontrolle wurde hierbei ein Variationskoeffizient von 0,5%, für die niedriger konzentrierte Kontrolle ein Wert von 0,72% ermittelt.



n	$X_{\max}$ [g/l]	$X_{\min}$ [g/l]	Mittl. Mittelw. [g/l]	Mittl. Stand.Abw. [g/l]	VK [%]
12	0,86	0,8	0,836	0,006	0,72

Abbildung 9

Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag mittels einer niedriger konzentrierten, wäßrigen Ethanolkontrolle (0,8g/l)



n	$x_{\max}$ [g/l]	$x_{\min}$ [g/l]	Mittl. Mittelwert [g/l]	Mittl. Stand.Abw. [g/l]	VK [%]
12	2,05	1,94	2,027	0,01	0,5

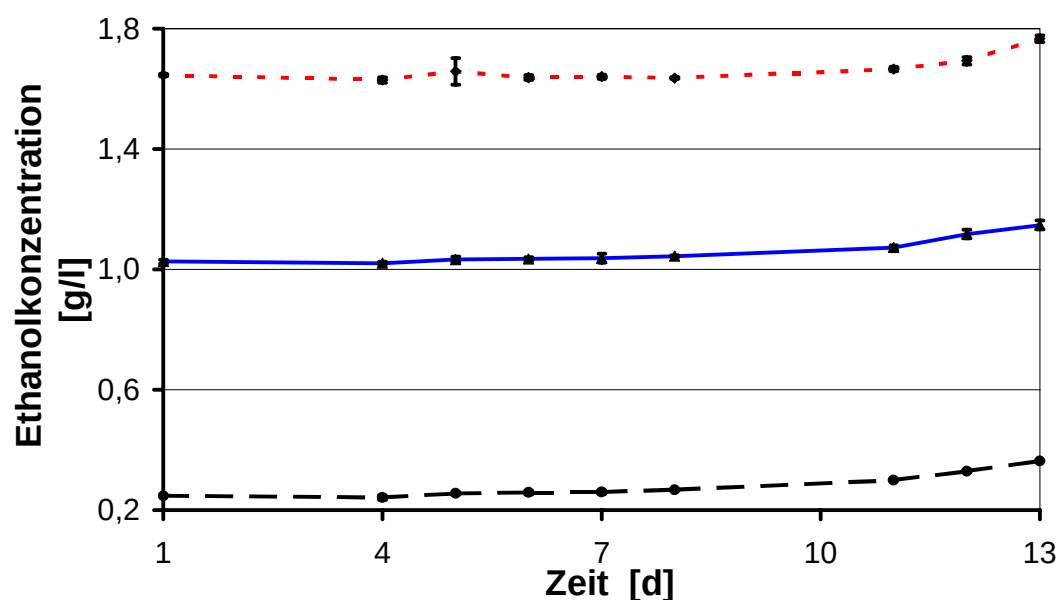
Abbildung 10

Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag mittels einer höher konzentrierten, wäßrigen Ethanolkontrolle (2g/l)

3.2.3 Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagenzien

Die Prüfung der Kalibrationsstabilität erfolgte mit drei kommerziellen Ethanolkontrollen unterschiedlicher Ethanolkonzentration der Firma Boehringer Mannheim über einen Zeitraum von 14 Tagen. Es handelte sich dabei um zwei Serum-Ethanolkontrollen und eine wässrige Ethanolkontrolle. Die Messungen wurden jeweils als Dreifachbestimmungen ohne zwischenzeitliches Kalibrieren durchgeführt.

Bis zum 11. Tag der Messungen blieben die Meßergebnisse konstant, ab dann stiegen sie jedoch bei allen Kontrollen leicht an. Der Variationskoeffizient betrug für die niedriger konzentrierte Kontrolle 14,88%, für die mittlere, wässrige Kontrolle 4,247% und für die höher konzentrierte Ethanolkontrolle 2,72%.



Konz. [g/l]	n	$x_{\max}$ [g/l]	$x_{\min}$ [g/l]	Mittl. Mittelwert [g/l]	Mittl. Stand.Abw. [g/l]	VK [%]
0,232	27	0,365	0,235	0,28	0,042	14,88
1	27	1,016	1,163	1,059	0,045	4,25
1,614	27	1,628	1,774	1,663	0,045	2,72

Abbildung 11

Bestimmung der Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagentien mit höher-(feingestrichelte Linie), mittel- (durchgezogene Linie) und niedriger konzentrierten (breit gestrichelte Linie) Alkohollösungen

3.2.4 Kreuzreaktivität anderer niedermolekularer Alkohole mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim

Aus kommerziellem Human-Leerserum und 100-fach verdünnten, wäßrigen Alkohollösungen (Ethanol, Methanol, 1-Butanol, 1-Propanol, Isopropanol, Isobutanol, Isoamylalkohol und 2-Butanol) wurden jeweils Proben mit einer Konzentration von 1g/l hergestellt. Zur gleichartigen Herstellung von Proben mit einer Konzentration von 4g/l wurde eine 10-fach verdünnte, wäßrige Stammlösung des jeweiligen Alkohols verwendet. Die mit Ethanol hergestellten Proben dienten als Kontrolle zur Objektivierung des Pipettierfehlers. Die Ermittlung der Kreuzreaktivität der verschiedenen Alkohole mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim erfolgte jeweils in 3-fach-Bestimmungen auf dem BM Hitachi 902.

Für 1-Propanol ergab sich hierbei im Mittel eine Kreuzreaktivität von 9,6% bei einer Konzentration von 1 g/l und von 9,7% bei einer Konzentration von 4 g/l. Die Kreuzreaktivität für 1-Butanol betrug im Mittel bei 1 g/l 2,8%, bei 4 g/l 2,7%. Die für die übrigen Alkohole ermittelten Kreuzreaktivitäten waren so gering, daß sie als forensisch irrelevant betrachtet werden können.

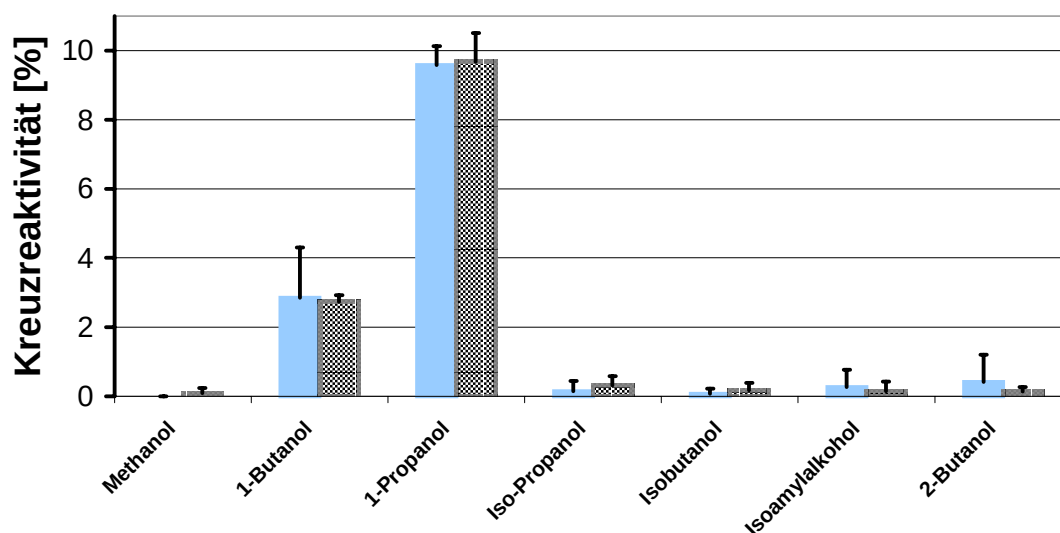


Abbildung 12

Kreuzreaktivität verschiedener Alkohole mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim (einfarbige Fläche entspricht der Alkoholkonzentration 1g/l; schraffierte Fläche entspricht der Alkoholkonzentration 4g/l)

3.2.5 Vergleich verschiedener Methoden zur Ethanolbestimmung

Verglichen wurden die ADH-Methode von Boehringer Mannheim, die ADH-Methode von Syva Co./Behring und Headspace-GC.

3.2.5.1 Vergleich von GC und der ADH-Methode von Boehringer Mannheim

Die mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim ermittelten Meßwerte zeigen eine hohe Korrelation ($R = 0,9976$) mit den durch die gaschromatischen Methode gewonnenen Werten.

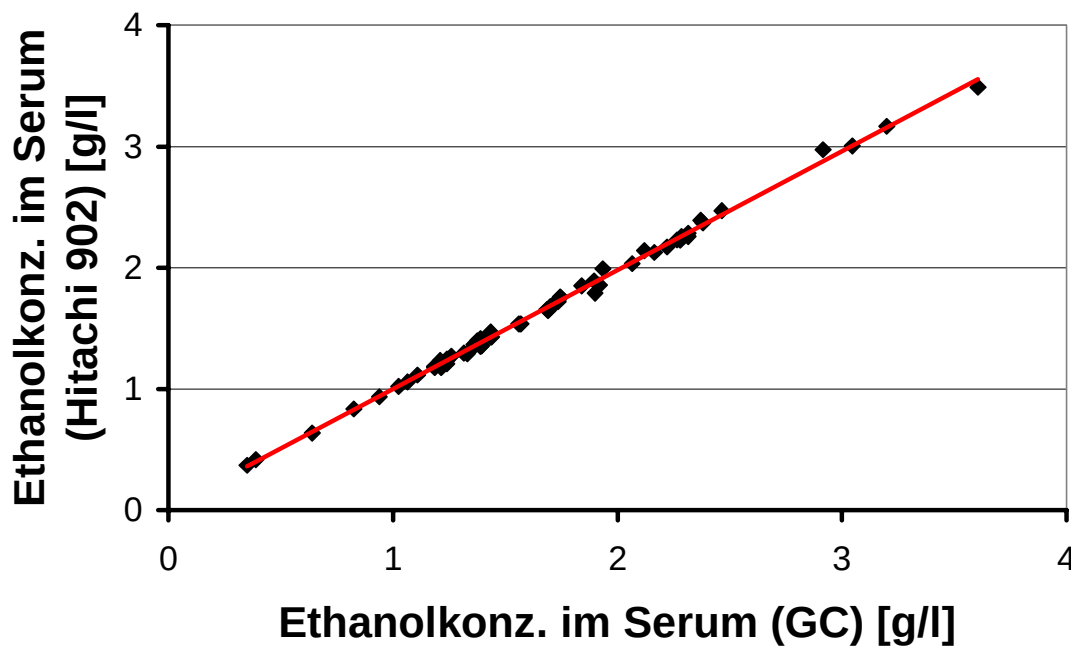


Abbildung 13

Vergleichende Untersuchung zur Bestimmung von Ethanol im Serum mittels Headspace-Gaschromatographie und der ADH-Methode von Boehringer Mannheim

3.2.5.2 Vergleich von GC und der ADH-Methode von Syva Co./Behring

Die mit der gaschromatischen Methode ermittelten Meßwerte zeigen eine hohe Korrelation ($R = 0,9976$) mit den durch die ADH-Methode von Syva Co./Behring gewonnenen Werten.

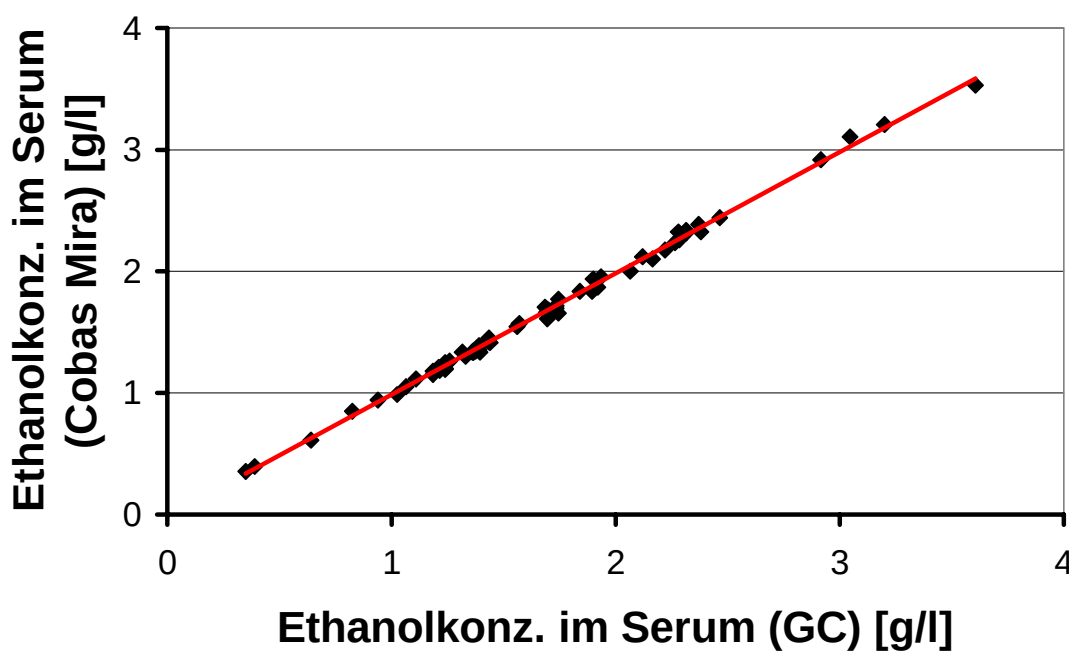


Abbildung 14

Vergleichende Untersuchung zur Bestimmung von Ethanol im Serum mittels Headspace-Gaschromatographie und der ADH-Methode von Syva Co./Behring

3.2.5.3 Vergleich der Methode von Boehringer Mannheim und Syva Co./Behring

Auch der Vergleich der Meßwerte zweier ADH-Methoden von unterschiedlichen Herstellern ergab eine gute Übereinstimmung ($R=0,9981$).

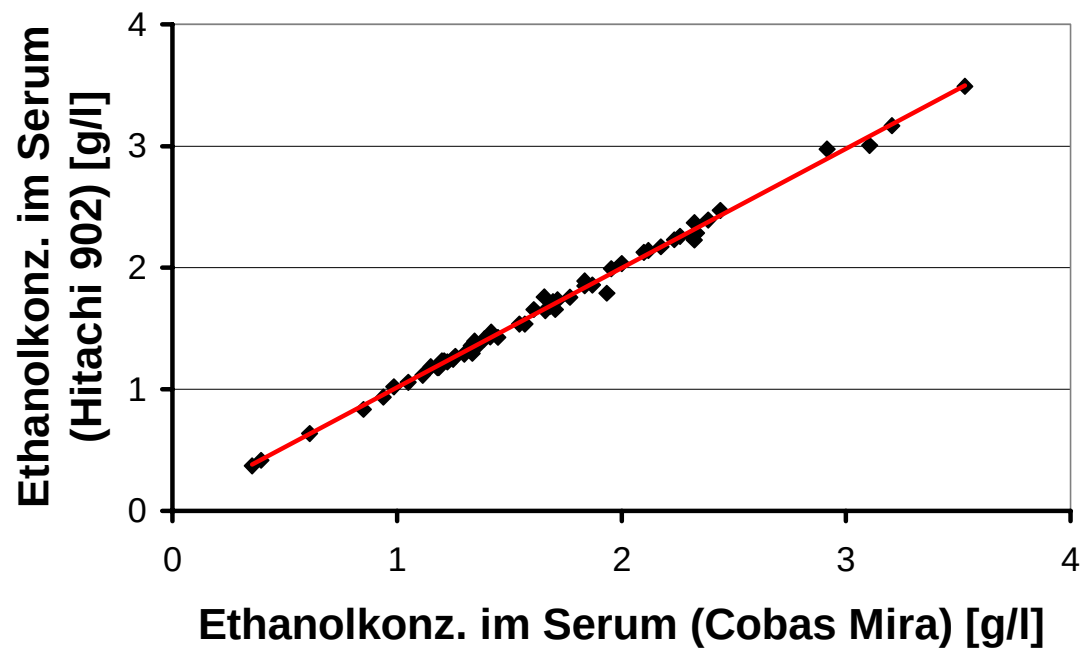


Abbildung 15

Vergleichende Untersuchung zur Bestimmung von Ethanol im Serum mittels der ADH-Methode von Boehringer Mannheim und der ADH-Methode von Syva Co./Behring

3.3 Diskussion

3.3.1 Headspace-Gaschromatographie

Die Headspace-Gaschromatographie zählt zu den spezifischen Nachweismethoden für Ethanol mit hoher Präzision und Richtigkeit. Bei diesem Verfahren ist weder ein Zusatz von Reagenzien noch eine Probenaufbereitung erforderlich. Der Nachweis ist bis zu einer Konzentration von 0,01 g/l möglich, Linearität besteht bis zu einer Konzentration von etwa 20 g/l. Für die Intrapräzision ergeben sich niedrige Variationskoeffizienten von 1,1% (0,5g/l), 1,1% (1,0 g/l) und 0,8% (2,5 g/l). Ethanol kann in der Probe anhand seiner Retentionszeit einwandfrei identifiziert werden, außerdem besteht die Möglichkeit der Erfassung von anderen Substanzen in der Probe (Begleitstoffe, Fäulnisalkohole). Die Bestandteile der Probenmatrix, die im Dampfraum der Headspace-Gaschromatographie zum größten Teil fehlen, können zwar frühzeitig die Qualität der Trennsäule mindern, führen aber nicht zu fehlerhaften Ergebnissen bei der Ethanolbestimmung (Pribilla und Schultek, 1980). Die zu früheren Zeiten angewendete Direkteinspritzung der Probe in den Gaschromatographen wurde aufgrund der schnellen Verschmutzung der Säulen weitestgehend zugunsten der Headspace-Gaschromatographie verlassen. Bezüglich der Säulen sind vorrangig Carboxen sowie Porapack Säulen wegen der guten Auftrennung von 1- Propanol und Ethanol zu empfehlen. Die Einführung der automatisierten Analysensysteme, die eine Bestimmung von bis zu 30 Proben hintereinander zulassen, bedeuten eine erhebliche Erleichterung in der Laborroutine. Gegenüber den anderen Analysenverfahren zur Ethanolbestimmung ist die längere Analysendauer von mindestens 3- 4 Minuten pro Probe nachteilig. Die Analysendauer verlängert sich noch, wenn bei Fäulnisblut gewartet werden muß, bis die Fäulnisalkohole n- Propanol und n- Butanol von der Säule eluieren. Die bei der Analyse erhaltenen Meßwerte müssen noch durch von der Probenmatrix abhängige Korrekturfaktoren dividiert werden (Vollblut: 1,08; Serum: 1,26; blutige Seren: 1,17). Das benötigte Probenvolumen konnte inzwischen von 500 µl auf 100 µl reduziert werden und liegt damit nur noch geringfügig über den bei anderen automatisierten Analysensystemen benötigten Mengen (Machata, 1967; Machata, 1970; Klug und Schmidt, 1981; Schmidt, 1982; Macchia, 1995).

3.3.2 Ethyl Alcohol Assay von Boehringer Mannheim

Der Boehringer Mannheim Assay hat einen niedrigen Cutoff von 0,1 g/l und ist über den Bereich von 0-4 g/l linear. Die Intrapräzisionsdaten ergeben Variationskoeffizienten von 1,542% für eine Konzentration von 1 g/l und 0,728% für eine Konzentration von 1,6 g/l. Die Interpräzision liegt bei 0,72% für eine Konzentration von 0,8 g/l und bei 0,5% für eine Konzentration von 2 g/l. Damit werden ähnlich gute Präzisionsdaten ermittelt, wie für die Gaschromatographie. Auch in der Praxis liefert das Verfahren sehr präzise Ergebnisse, so daß erneute Bestimmungen aufgrund zu hoher Abweichungen zwischen den Meßergebnissen der verwendeten Verfahren nur selten erforderlich sind. Bei der Prüfung der Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim-Reagenzien blieben die Meßergebnisse über 11 Tage stabil, dann war ein leichter Anstieg aller Meßwerte zu verzeichnen. Eine Kalibration ist also ungefähr alle 14 Tage zu empfehlen. Im Routine-Betrieb hat sich allerdings gezeigt, daß nach einer gewissen „Eingewöhnungsphase“ des Geräts (BM Hitachi 902) die Meßergebnisse wesentlich länger stabil bleiben. Dies zeigte sich auch bei den Ergebnissen unseres Labors im

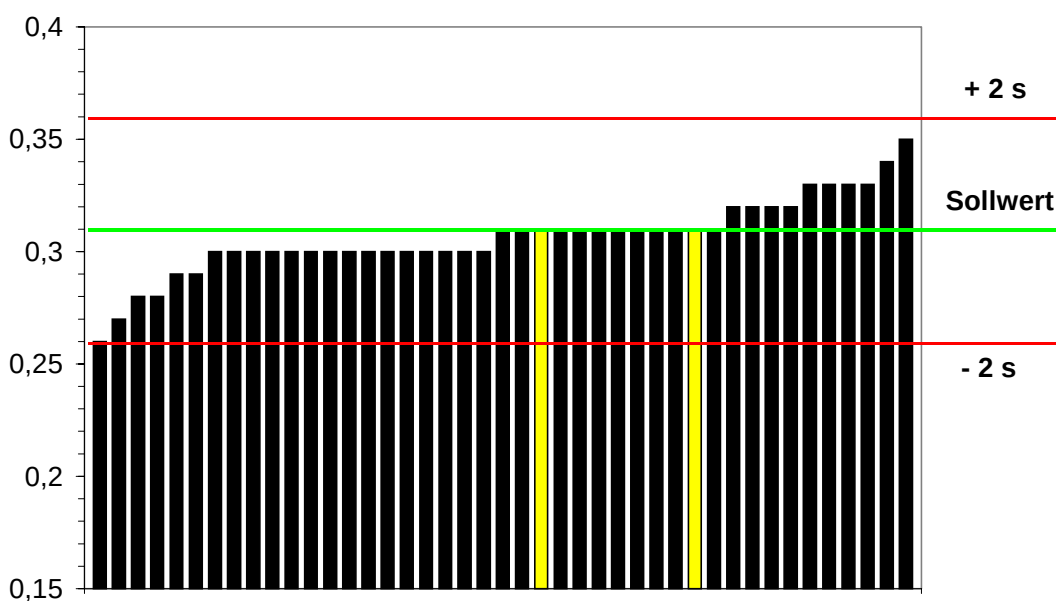


Abbildung 16

Ergebnisse des Ringversuchs der GTFCh 1/99 zur Bestimmung von Ethanol in Serum mit der ADH-Methode (An dem Ringversuch nahmen 22 Labors teil; jeder Balken steht für eine Einzelbestimmung; die beiden hellen Balken stellen die in unserem Labor mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim ermittelten Ergebnisse dar. Die in der Abbildung eingezeichneten mit + 2 s/- 2 s bezeichneten Linien entsprechen der Zielstandardabweichung)

Ringversuch der GTFCh 1/99. Mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim wurde der Ethanolgehalt einer Serumethanolprobe mit unbekannter Ethanolkonzentration bestimmt. Es erfolgte die zweimalige Untersuchung der Probe. Die Ergebnisse beider Bestimmungen entsprachen dem Sollwert. Die Präzision und die Richtigkeit der Messungen mit der ADH-Methode von Boehringer Mannheim wurden damit als gut bewertet (vergleiche Abbildung 16).

Untersuchungen zur Kreuzreaktivität haben lediglich für 1-Propanol und 1-Butanol deutliche Kreuzreaktivitäten von jeweils 9,7% und 2,8% gezeigt. Ein falsch-positives Ergebnis wäre hiermit allerdings nur bei einer Konzentration von 4 g/l 1-Propanol (Meßergebnis: 0,35 g/l) möglich. Bei einer solchen Konzentration von 1-Propanol im Blut, die nur durch orale Zufuhr von Lösungsmitteln auftreten kann, würden allerdings Krankheitserscheinungen auftreten, die ebenfalls die Handlungsfähigkeit oder Verkehrstüchtigkeit erheblich einschränken würden (Schütz, 1983). Damit sind die ermittelten Kreuzreaktivitäten für die Praxis weitgehend bedeutungslos. Für die restlichen untersuchten Alkohole konnten keine relevanten Kreuzreaktivitäten ermittelt werden. Der Test ist für Serumproben konzipiert, es ist aber auch möglich, abzentrifugierte Urinproben zu untersuchen. Eine Aufbereitung der Serumproben ist nicht notwendig. Fäulnisblutproben sowie hämolytische (alte) und extrem lipämische Proben führen sehr häufig zu falschen Meßergebnissen oder Fehlermeldungen. Das benötigte Probenvolumen liegt bei 50-70 µl. Aber auch, wenn nur geringere Probenmengen zur Verfügung stehen, kann in einigen Fällen noch ein korrektes Meßergebnis erhalten werden. Mit einer Anzahl von 35 Proben pro Teller und einer Durchlaufgeschwindigkeit von 15 Minuten ist der Boehringer Mannheim Assay auf dem BM Hitachi 902 wesentlich weniger zeitaufwendig als die Gaschromatographie und andere ADH-Assays. Bei dem Vergleich des der Boehringer Mannheim Assays mit Headspace-Gaschromatographie und dem EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay auf dem Cobas Mira konnte eine gute Korrelation zwischen den Meßwerten aller Verfahren festgestellt werden (BM/HSGC: 0,9976; Syva/HSGC: 0,9976; BM/Syva: 0,9981).

3.3.3 TD_x REA[®] Ethanol Assay von Abbott

Der TD_x REA[®] Ethanol Assay auf dem TD_x-Analyser hat ebenfalls einen niedrigen Cutoff von 0,1 g/l, der Meßbereich ist aber nur von 0-3 g/l linear. Dies entspricht nicht immer den Bedürfnissen eines forensischen Labors, zumal die Blutalkoholkonzentration einen Wert von 3 g/l gar nicht so selten überschreitet und bei solchen Werten auch

durchaus noch Handlungsfähigkeit bestehen kann (Jones, 1999). Liegt eine Probe oberhalb des linearen Bereichs, so muß sie verdünnt werden, um die korrekte Blutalkoholkonzentration ermitteln zu können. Dies bedeutet Zeitverlust und Arbeitsaufwand. Für die Intrapräzision und Interpräzision gibt es bezüglich der Variationskoeffizienten in der Literatur unterschiedliche Angaben.

Autor	Caplan und Levine 1986	Jortani und Poklis 1993	Mebs <i>et al.</i> 1996
Intrapräzision	0,4 g/l: 4,97% 1,0 g/l: 3,83% 2,5 g/l: 1,81%	1,5 g/l: 2,3%	0,5 g/l: 6,4% 2,0 g/l: 2,29% 4,0 g/l: 1,37%
Interpräzision	0,4 g/l: 6,92% 1,0 g/l: 5,72% 2,5 g/l: 4,11%	0,5 g/l: 3,0% 1,0 g/l: 2,7% 2,5 g/l: 2,8%	0,8 g/l: 3,42% 1,0 g/l: 2,7%

Für die Korrelation der Meßwerte zwischen dem TD_x REA[®] Ethanol Assay und der Headspace Gaschromatographie konnten in der Literatur Korrelationskoeffizienten von 0,985 (Jortani und Poklis, 1993), 0,991 (Caplan und Levine, 1986) und 0,9977 (Mebs *et al.*, 1996) gefunden werden. Spezielle Interferenzen mit niedermolekularen Alkoholen oder Ketonen wurden nicht gefunden (Jortani und Poklis, 1993). Geringfügige Interferenzen traten bezüglich dem Vorliegen von erhöhten Serumlactat- und LDH-Spiegeln in Proben auf. Von 19 untersuchten Proben ergaben 5 ein falsch-positives Ergebnis (Nine *et al.*, 1995). Der TD_x REA[®] Ethanol Assay benötigt lediglich ein Probenvolumen von 50 µl, was bei den teilweise geringen Probenmengen von Vorteil sein kann. Der Test ist einfach in der Anwendung und benötigt keine weitere Probenaufbereitung. Mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 20 Proben in 20 Minuten bleibt er deutlich hinter dem Boehringer Mannheim Test auf dem BM Hitachi 902 zurück, ist aber immer noch schneller als die Gaschromatographie (Caplan und Levine, 1986). Alt und Reinhardt fanden 1996, daß die gemessenen Werte bei dem TD_x REA[®] Ethanol Assay im Schnitt höher lagen und stärkere Abweichungen nach oben und unten aufwiesen als bei der Headspace-Gaschromatographie und herkömmlichen ADH-Verfahren. Hierbei wurden die zulässigen Grenzen für forensische Fragestellungen teilweise überschritten.

3.3.4 ALC Ethyl Alcohol Assay von Du Pont De Nemours

Der ALC Ethyl Alcohol Assay hat einen niedrigen Cutoff von 0,1 g/l und ist wie der TD_x REA[®] Ethanol Assay nur über den Bereich von 0-3g/l linear. Die Intrapräzision liegt bei 1,09% für eine Konzentration von 1 g/l und bei 1,74% für eine Konzentration von 1,7 g/l. Die Interpräzision liegt bei 1,56% für eine Konzentration von 1 g/l, 1,41% für eine Konzentration von 1,5 g/l und bei 2,4% für eine Konzentration von 2 g/l. Die Präzision der Methode genügt damit forensisch-toxikologischen Anforderungen. Bezüglich der Kreuzreaktivität mit anderen niedermolekularen Alkoholen ergaben sich erhebliche Interferenzen mit 1-Propanol (70%) und 1-Butanol (50%). Hämolytische oder lipämische Seren können nur nach einer Enteiweißung einer Ethanolbestimmung unterzogen werden, dies bedeutet einen weiteren Arbeitsschritt und somit Zeitverlust. Das Probenvolumen für die Analyse mit dem Automatic Clinical Analyzer (ACA[®]) muß mindestens 0,15 ml betragen, bei längerer Analysendauer wird aufgrund der Flüchtigkeit von Ethanol sogar eine Menge von 0,5 ml empfohlen. Ein so großes Probenvolumen kann unter Umständen schwer bereitzustellen sein, insbesondere, wenn das Material noch auf das Vorhandensein anderer Substanzen untersucht werden soll (Gibitz und Schütz, 1993).

3.3.5 EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay von Syva Co./Behring

Der EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay wird auf dem geschlossenen Analysensystem Cobas Mira eingesetzt. Mit einem Cutoff von 0,1 g/l und einem linearen Bereich bis 6,5 g/l steht diese Variante der ADH-Methode, was die diesbezügliche Praktikabilität betrifft, nur hinter der Gaschromatographie zurück. Für die Präzision in der Serie ergeben sich Variationskoeffizienten von 6,1% (0,25 g/l), 5,8% (0,40 g/l), 3,7% (1,0 g/l), 3,5% (3,0 g/l) und 4,5% (5,0 g/l). Die Präzision von Tag zu Tag liegt bei 4,9% (0,25 g/l), 5,0% (0,40 g/l), 4,3% (1,0 g/l), 3,3% (3,0 g/l) und 5,0% (5,0 g/l). Die Meßergebnisse des EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay stimmen gut mit denen anderer Tests überein, so zeigt sich eine Korrelation von 0,984 zwischen dem EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay und dem TD_x REA[®] Ethanol Assay. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay und der Headspace Gaschromatographie liegt bei 0,971. Am besten ist die Korrelation mit dem ALC Ethyl Alcohol mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,993. Interferenzen des Tests mit anderen, niedermolekularen Alkoholen oder Ketonen wurden nicht beobachtet

(Jortani und Poklis, 1992). Allerdings wurden Interferenzen mit LDH und Lactat beim Vorliegen außergewöhnlich hoher Serumspiegel festgestellt, die in der Regel nur bei Personen auftreten, die unter einer schweren, konsumierenden Erkrankung (finale Leberzirrhose, Leukämien) leiden. Bei dieser Untersuchung war der EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay am schwersten von dieser Problematik betroffen. Von 19 Proben mit erhöhten Serumlactat- und LDH-Spiegeln waren 17 Meßergebnisse positiv. In keiner Probe ließ sich gaschromatographisch Ethanol nachweisen. Obwohl wissenschaftlich interessant sind diese Ergebnisse für die Praxis von eher geringer Bedeutung, da solche Fälle im Routine- Alltag sicher die Ausnahme darstellen. Dies wird noch verständlicher, wenn man bedenkt, daß 17 der 19 Proben während Autopsien gewonnen wurden und nicht etwa an vitalen Menschen, die z. B. am Straßenverkehr teilgenommen haben (Nine *et al.*, 1995; Winek und Wahba, 1996). Auch der EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay benötigt ein Probenvolumen von 50–100 µl und liegt damit im Bereich der meisten anderen Verfahren.

4 Vergleichende Untersuchung zur Validität neuer Verfahren der LSD-Bestimmung in Körperflüssigkeiten

4.1 Theoretische Grundlagen

4.1.1 Geschichtlicher Rückblick

1938 gelang Albert Hofmann erstmalig die Synthese von LSD (es war die 25. Substanz, die er herstellte, daher auch die ursprüngliche Bezeichnung LSD-25). Die Substanz entsprach jedoch nicht den Erwartungen, denn A. Hofmann hatte nicht mit einem potenten Halluzinogen, sondern wegen der Ähnlichkeit von LSD mit dem damals als Analeptikum eingesetzten Nikotinsäurediethylamid mit einer Substanz gerechnet, die eventuell als Atem- oder Kreislaufstimulans eingesetzt werden konnte. Obwohl für LSD im Tierversuch eine Wirkung auf die Gebärmutter festgestellt werden konnte, wurden zunächst keine weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen über die Substanz durchgeführt.

Fünf Jahre später stellte A. Hofmann die Substanz mit der Vermutung, daß sie vielleicht doch wertvolle Wirkungen besäße, erneut her. Diesmal bekam er zufällig die halluzinogene Wirkung von LSD am eigenen Leibe zu spüren. Nun folgten zahlreiche Tierversuche, die nötig waren, um Erkenntnisse über Pharmakokinetik und –dynamik, aber insbesondere über die Toxizität der Substanz zu erlangen. Die durch LSD bewirkten psychischen Veränderungen der Versuchstiere waren nicht gut beurteilbar. Später folgten dann Untersuchungen an schizophrenen Patienten einer Klinik für Psychiatrie in Zürich und einer Kontrollgruppe von gesunden Probanden. Die Annahme, LSD könne in der Psychotherapie von Nutzen sein, beruhte auf der Vorstellung, daß die Wirkung des Halluzinogens vergessene Erlebnisse in der Kindheit wieder zugänglich machen würde. Etwa zehn Jahre nach der Entdeckung des LSD wurde die Substanz in Amerika zur Rauschdroge Nummer 1. Die daraus resultierenden Schwierigkeiten und unangenehme Popularität, die sowohl „LSD-Jünger“, als auch unter dem Einfluß der Droge begangene Straftaten und Suizide verursachten, bewegten Sandoz 1966 dazu, die Abgabe von LSD zu sperren. 1971 wurde die Droge weltweit verboten und in Deutschland auch im medizinischen Sektor nicht weiter verwendet. A. Hofmann beschäftigte sich in der Zeit vor dem Verbot von LSD mit anderen Halluzinogenen, so dem Psilocybin (*Psilocybe mexicana* = Teonacatl-Pilze) und dem

Lysergamid (Ololiuqui). 1972 beendet er seine Tätigkeit bei Sandoz (Hofmann, 1997). Heute gibt es neue Ansätze, LSD als Therapeutikum zu Forschungszwecken, z.B. in der Therapie des Alkoholismus einzusetzen (Mangini, 1998).

4.1.2 Pharmakokinetik

Das Wissen über den Stoffwechsel von LSD ist trotz intensiver Forschung sehr begrenzt. LSD wird üblicherweise in Dosierungen von 25-100 µg zugeführt, bei Dosierungen über 200 µg ist die Gefahr des Auftretens eines Horror-Trips größer. Die letale Dosis für den Menschen wird bei etwa 150 mg vermutet, also dem etwa 500-600-fachen der normalen Dosis (Geschwinde, 1985). LSD führt weder zu einer psychischen noch zu einer physischen Abhängigkeit, bewirkt allerdings eine ausgeprägte Toleranzentwicklung (Kunkel, 1971; Moffat *et al.*, 1986).

4.1.2.1 Resorption

Nach peroraler Applikation und vollständiger Resorption im Gastrointestinaltrakt wird die höchste Plasmakonzentration (von etwa 4-6 µg/l bei einer Dosis von 2 µg/kg KG) etwa eine Stunde nach Einnahme erreicht. LSD verschwindet dann jedoch sehr schnell aus der Blutbahn, um sich in ganzen Körper zu verteilen (Baselt, 1995).

4.1.2.2 Metabolisierung

LSD unterliegt einem ausgeprägten Metabolismus, dessen Wege noch wenig geklärt sind. Nur ungefähr 1% der Droge wird unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Bisher in Urin von LSD-Konsumenten nachgewiesene Metaboliten sind Nor-LSD und Konjugate von 13- und 14-Hydroxy-LSD (Lim *et al.*, 1988; Nelson und Foltz, 1992) sowie Iso-LSD (von dem allerdings vermutet wird, daß es auch als Verunreinigung bereits in von LSD-Konsumenten eingenommenen LSD-Trips enthalten sein könnte (Clarkson *et al.*, 1998)), Isonor-LSD, Lysergsäureethylamid und Iso-Lysergsäureethylamid (Cai und Henion, 1996). Ergebnisse aus Tierversuchen sowie in vitro Versuche mit der Mikrosomenfraktion der Leber lassen allerdings vermuten, daß es noch eine Reihe anderer Stoffwechselprodukte gibt, die aber entweder nicht sicher identifiziert werden konnten oder deren Übertragbarkeit auf in vivo Verhältnisse fraglich ist. So wurden bei in vitro Experimenten sicher Lysergsäureethylamid und 2-Oxo-LSD identifiziert (Cai und Henion, 1996). Bei neueren Untersuchungen konnte mit dem nicht konjugierten 2-Oxo-3-Hydroxy LSD ein weiterer Metabolit gefunden

werden, der in 4-40fach höherer Konzentration als LSD im Urin vorliegt und bis zu 96 Stunden erfaßt werden kann und damit für den Nachweis des LSD-Abusus viel geeigneter erscheint als die Muttersubstanz. Leider ist die Kreuzreaktivität der momentan vorhandenen Screeningmethoden mit 2-oxo-3-Hydroxy LSD gering (EMIT[®]: 1,8%; CEDIA[®]: 1,7%; KIMS[®]: 11%)(Poch *et al.*, 1999; Verstraete und Van de Velde, 1999). Da die Identifizierung der wichtigsten Metaboliten im LSD-Stoffwechsel für die Entwicklung verlässlicher Nachweismethoden von großer Bedeutung sein könnten, ist auf diesem Gebiet in Zukunft sicherlich mit weiteren Ergebnissen zu rechnen.

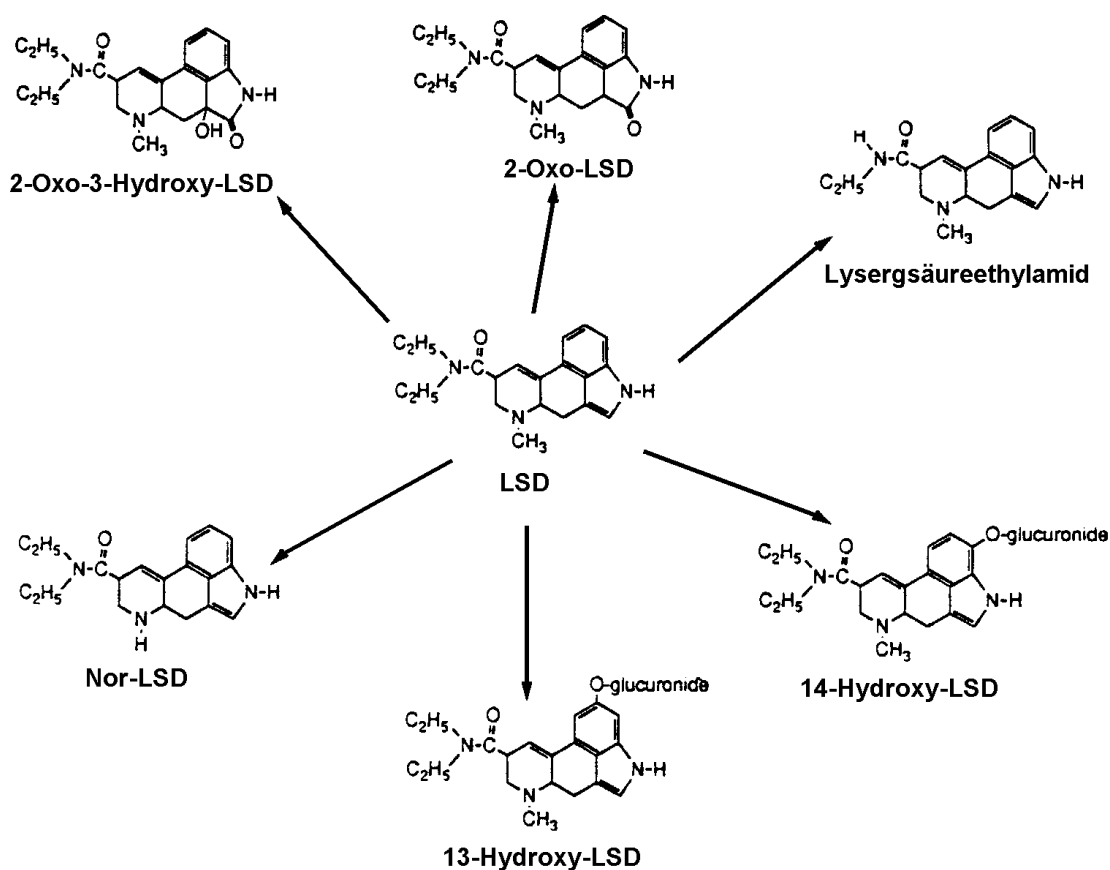


Abbildung 17

Metabolismus von Lysergsäurediethylamid

4.1.2.3 Elimination

Nur etwa 1-2% des LSD werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Da die Halbwertszeit von LSD nur 3-5 Stunden beträgt, ist bereits nach kurzer Zeit damit zu rechnen, daß die Urinkonzentration unter 1 ng/ml abfällt, was den Nachweis von LSD

aus den Körperflüssigkeiten in einem hohen Maße erschwert (Moffat *et al.*, 1986; Baselt, 1995).

4.1.3 Pharmakodynamik

4.1.3.1 Wirkungsmechanismus

Die genaue Bestimmung der Wirkungsweise von LSD ist nach heutigen Erkenntnissen ähnlich komplex wie der Versuch, menschliches Verhalten insgesamt aufzuschlüsseln. Die beim Genuß dieser Droge ablaufenden Prozesse können auch nach aktuellen Erkenntnissen nur ungefähr beschrieben werden und stützen sich zu großen Teilen noch immer auf Vermutungen. Der Botenstoff Serotonin spielt bei diesen Vermutungen eine große Rolle, denn das LSD-Molekül besitzt eine auffällige Ähnlichkeit mit Serotonin. Vom Botenstoff Serotonin wird angenommen, daß er hemmend wirkt und somit das Gehirn vor Reizüberflutung schützt. Aufgrund der Ähnlichkeit der Molekülstrukturen wird nun vermutet, daß sich LSD auf die Serotonin-Aktivitäten- vermutlich als Serotonin-Agonist bzw. als partieller Serotonin-Agonist an 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Estler, 1995) und an 5-HT_{1C}- Rezeptoren (Burris *et al.*, 1991) sowie als kompetitiver Serotonin-Antagonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Watkins und Newberry, 1996) bzw. als partieller Agonist an 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Marek und Aghajanian., 1996) - im Gehirn auswirkt. Ist dies der Fall, so kann davon ausgegangen werden, daß Halluzinogene wie das LSD indirekte Auswirkungen auf die gesamte Verarbeitung von Sinneseindrücken im Gehirn haben und auf diese Weise die traumähnlichen Trancezustände hervorrufen. Es ist vorstellbar, daß eine Dysbalance des serotonergen-dopaminergen und des glutamatergen-dopaminergen Systems für das klinische Bild der drogeninduzierten Psychose verantwortlich ist (Vollenweider, 1998).

4.1.3.2 Wirkung

Die Wirkung von LSD beginnt 30-90 Minuten nach Einnahme der Droge und hält etwa 5-14 Stunden an (Schneider *et al.*, 1998). LSD beeinflusst die zentralnervösen Funktionen des Menschen. Das Rauscherlebnis unterliegt sowohl einer großen interindividuellen als auch intraindividuellen Schwankung. Auch scheinen Stimmung und Gemütszustand eine wichtige Rolle bei der Rauschwahrnehmung zu spielen. Grundsätzlich kann das Erleben der Umwelt durch alle Sinne verändert sein. Tatsache ist, daß die Einnahme von LSD im Allgemeinen zu bewußt wahrgenommenen

Halluzinationen führt, die sich in Art und Umfang nur schwer vorhersagen lassen. Alle Farben sind von einer starken Intensität, vor dem inneren Auge werden kaleidoskopartige Bilderfolgen wahrgenommen. Die akustischen Wahrnehmungen sind nur selten verändert, häufig besteht nur eine Empfindlichkeit gegenüber lauten Geräuschen. Perspektiven und Dimensionen sowie das Zeitgefühl während des Rausches scheinen verändert. Konsumenten dieser Droge erzählen unter anderem von traumartigen Zuständen und Persönlichkeitsverlusten wie dem Gefühl „neben sich zu stehen“ und von Sinnesverschiebungen wie der scheinbaren Fähigkeit, Farben hören und Töne sehen zu können. Der eigene Körper bzw. Teile von ihm scheinen fremd zu sein, Körperformen stellen sich deformiert dar. Die Reflexe der Patienten sind deutlich gesteigert, die Stimmungslage kann euphorisch bis expansiv sein. Es kommen aber auch dysphorische Stimmungen bis zu sogenannten Horror-Trips vor, die von alptraumartiger Natur sind (Bron, 1979). Albert Hofmann schreibt über seinen ersten Selbstversuch mit LSD: „Kaleidoskopartig sich verändernd, drangen bunte, phantastische Gebilde auf mich ein, in Kreisen und Spiralen sich öffnend und wieder schließend, in Farbfontainen zersprühend, sich neu ordnend und kreuzend, in ständigem Fluß.“ Künstler, die vor und nach Ingestion von LSD ein Objekt darstellten, befanden die unter dem Drogeneinfluß gefertigten Werke als künstlerisch wertvoller und erklärten, daß sie sich während des Rausches kreativer und voller neuer Impulse gefühlt hätten (Janiger und Dobkin de Rios, 1989). Auch die Gefahr der Auslösung einer latenten Psychose bei wiederholtem LSD-Gebrauch ist beschrieben worden (Bron *et al.*, 1976). Bis zu fünf Jahren nach dem letzten LSD-Abusus kann es zu Flashbacks kommen, d.h., zu dem Rausch ähnlichen Zuständen, allerdings ohne erneute Einnahme der Droge. Flashbacks sind positiv mit der Häufigkeit der Einnahme der Droge korreliert und treten bei Alkoholikern, die gleichzeitig LSD-Abusus betreiben häufiger auf (Batzner *et al.*, 1999). Es wird vermutet, daß dieser Effekt auf die toxische Schädigung von 5-HT₂-Rezeptoren zurückzuführen ist. Hierbei treten auch EEG-Veränderungen und eine Verkürzung der Latenzzeit visuell evozierter Potentiale auf (Abraham und Aldridge, 1993; Abraham und Duffy, 1996). Zusätzlich zu der psychischen Symptomatik kommt es zu Veränderungen, die der sympathomimetischen Wirkung entsprechen (Breachreiz, Schwindel, Kälte- oder Hitzegefühl, Mydriasis, Blutdrucksteigerung, Tachykardie).

4.1.3.3 Therapie der LSD-Intoxikation

Die LSD-Intoxikation manifestiert sich häufig in Form eines Horror-Trips. Als Therapie-Optionen kommen die Gabe von Benzodiazepinen (z.B. Lorazepam) und Neuroleptika (z.B. Haloperidol) sowie beruhigendes Einwirken auf den agitierten Patienten in Frage (Miller, 1992).

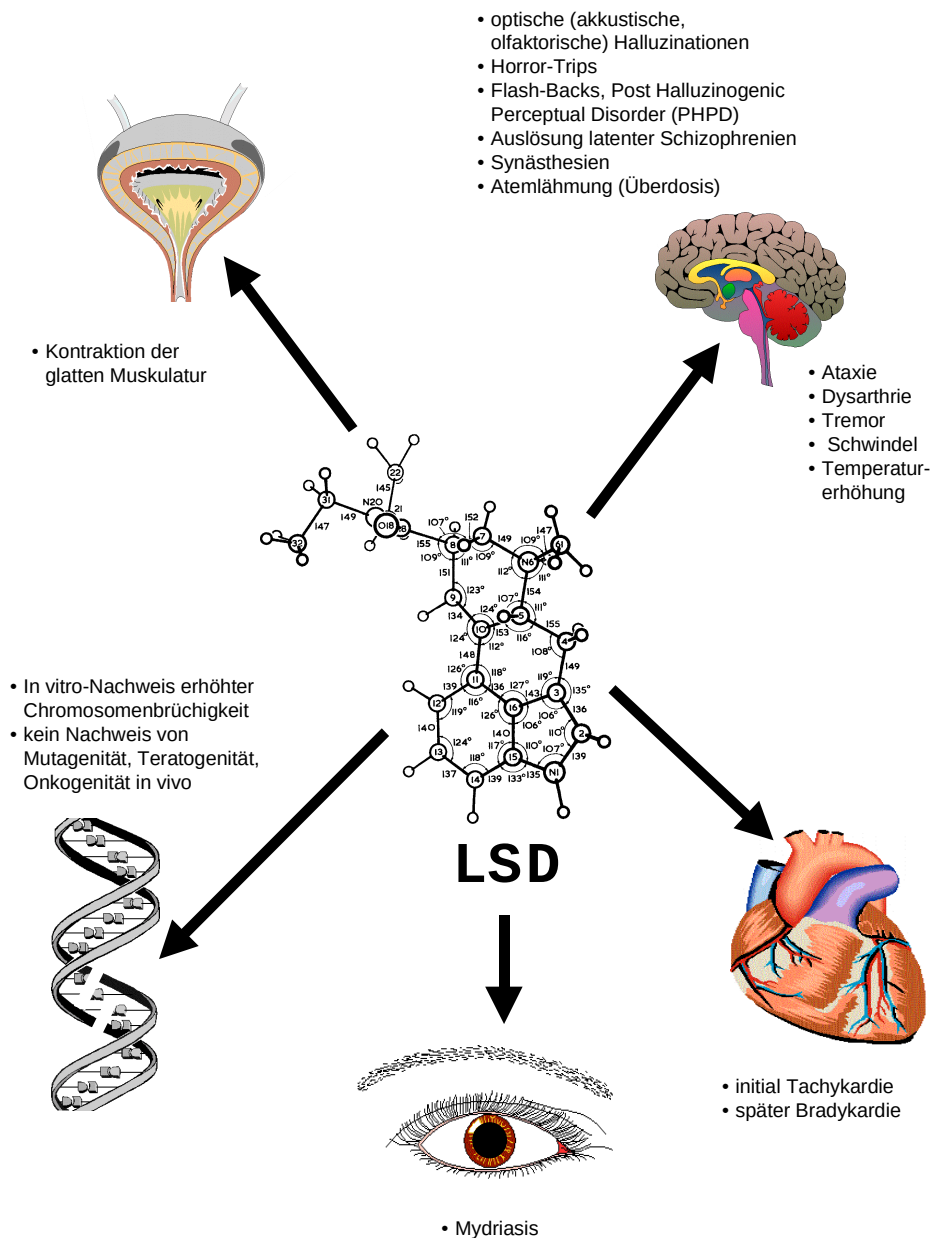


Abbildung 18

LSD-Wirkungen auf Auge, ZNS, Kleinhirn, glatte Muskulatur, DNA und Herz.

(Hesse, 1966; Kunkel, 1971; Abraham and Aldridge, 1993; Li und Lin, 1998; Halpern und Pope, 1999)

4.1.4 Nachweisverfahren

4.1.4.1 Screeningmethoden

4.1.4.1.1 Immunoassays

Immunoassays sind heutzutage fester Bestandteil klinischer und forensisch-toxikologischer Laboratorien. Mittels ihrer hohen Sensitivität kann aus einer großen Menge Proben eine kleine Gruppe potentiell „positiver“ Proben herausgefiltert werden. Dieses reduziert den Arbeitsaufwand im Labor erheblich, da „negative“ Proben nach dem Prinzip „In dubio pro reo“ in der Regel nicht weiter untersucht werden müssen. Dem Immunoassay liegt die Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde. Die Produktion der meist monoklonalen Antikörper erfolgt durch die Einbringung des an ein hochmolekulares Trägermolekül gebundenen relevanten Antigens in ein Versuchstier oder eine Zellkultur. Die häufig niedermolekularen Substanzen (Haptene), gegen die Antikörper gebildet werden sollen, sind ohne dieses Trägermolekül (z.B. Albumin) nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Bezüglich des Funktionsprinzips der Immunoassays gibt es unterschiedliche Ansätze. Immunoassays, die keinen weiteren Reinigungsschritt benötigen werden als homogene Immunoassays bezeichnet. Sie sind praktischer in der Anwendung, aber lediglich für die Detektion niedermolekularer Substanzen geeignet. Bei den heterogenen Immunoassays werden die ungebundenen Antigene ausgewaschen, sie sind für niedermolekulare und hochmolekulare Antigene geeignet. Eine Variante der Immunoassays sind die Radioimmunoassays, bei denen das Antigen radioaktiv markiert ist. Bei diesen heterogenen Immunoassays erfolgen die Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltene Substanzkonzentration über die Messung der nach dem Auswaschen noch vorhandenen Radioaktivität. Eine weitere Variante stellt der Enzymimmunoassay dar, bei dem das Enzym die Markierung darstellt. Mit Enzym markiertes Antigen konkurriert mit freiem Antigen aus der Probe um eine begrenzte Menge von Antikörpern. Wird markiertes Antigen weitgehend an die vorhandenen Antikörper gebunden -ist also wenig konkurrierendes, nicht-markiertes Antigen in der Probe enthalten- so bleibt das Enzym inaktiv und setzt kein Substrat um. Bei der Umsetzung von Substrat wird in der Regel $\text{NADH} + \text{H}^+$ produziert, welches eine Extinktionsänderung der Lösung bei 340 nm bewirkt, die photometrisch bestimmt werden kann. Eine relativ neue Methode ist die KIMS[®]-Methode von Roche, bei der in Lösung befindliche, mit LSD markierte Mikropartikel aus Latex und freies LSD um die

Antikörper des Tests konkurrieren. Befindet sich kein LSD in der Probe, binden die Antikörper an die LSD- markierten Mikropartikel, es kommt zur Agglutination. Umgekehrt kommt es bei Vorhandensein von freiem LSD in der Probe nicht zur Agglutination, da die in der Lösung vorhandenen Antikörper bereits zum Teil mit dem freien LSD konjugiert sind. Die agglutinierten Mikropartikel absorbieren Licht stärker als die nicht agglutinierten Mikropartikel. Es erfolgt eine Endpunktmessung, das heißt, es wird die Lichtabsorption zu Beginn der Messung und die Lichtabsorption nach Abschluß der Reaktion festgestellt. Je stärker die photometrisch erfaßte Differenz der beiden Werte ist, desto größer ist die LSD- Konzentration in der Probe (Armbruster *et al.*, 1993).

4.1.4.2 Bestätigungsanalysen

4.1.4.2.1 HPLC

Bei der Hochleistungs- oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wird eine mobile Phase unter hohem Druck durch die Säule mit der stationären Phase gepumpt. Die stationäre Phase besteht in der zur Zeit am häufigsten eingesetzten Reversed-Phase-HPLC aus unpolaren, chemisch gebundenen, nicht auswaschbaren also sehr stabilen Materialien. Darin unterscheidet sie sich von der Verteilungschromatographie, bei der die stationäre Phase eine geringere Stabilität aufweist und von der Adsorptionschromatographie durch deren polare stationäre Phase sowie die wesentlich kleinere Probenkapazität. Bei der RP-HPLC werden wäßrige, gepufferte Lösungen mit unterschiedlichen Anteilen organischer Lösungsmittel als Fließmittel verwendet. Bei der HPLC können im Gegensatz zur GC auch thermolabile und hochmolekulare Substanzen chromatographiert werden, bzw. niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden. Eine HPLC-Apparatur besteht aus einem oder mehreren Fließmittelvorratsbehältern und einer oder mehreren Hochdruckförderpumpen sowie eventuell einem Mischer, je nachdem, ob man mit einem isokratischen System oder Gradientensystem arbeiten möchte. Die weiteren Bestandteile sind gegebenenfalls ein Pulsationsdämpfer, ein Druckmesser, ein Injektor (Probeneinlaß), eine Vor- und eine Trennsäule, ein oder mehrere Detektoren und einer Signalverarbeitungs- und Dokumentationseinheit. Bei der RP-HPLC werden als Säulenmaterial Octadecylsilan-Phasen (ODS- Phasen, C18 Material) verwendet, bei denen durch Umsetzung mit Trimethylchlorsilan die Anzahl der polaren Gruppen auf der Oberfläche weiter

verringert werden können. Das Elutionsverhalten der Proben von der Säule kann durch Änderung der Temperatur, der Fließgeschwindigkeit und des Fließmittels erreicht werden. Meist werden die Änderungen der Retentionszeiten durch Variation der Fließmittelzusammensetzung erreicht, da dies die größte Effizienz zeigt und außerdem materialschonend ist. Bei der sogenannten Gradientenelution können Fließmitteleigenschaften während eines Probenlaufs verändert werden. Dies erbringt Vorteile bei der Chromatographie schwierig zu trennender Substanzen, ist aber auch teurer und aufwendiger als die Verwendung isokratischer Systeme (Unger, 1989).

4.1.4.2.2 HPTLC

Bei der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) befindet sich die üblicherweise 250 µm hohe stationäre Phase aus Kieselgel, bzw. modifiziertem Kieselgel, Aluminiumoxid, Cellulose oder Ionenaustauschern auf einem Glas-, Polyester- oder Aluminiumträger. Das Kornspektrum beträgt in der Regel 2 – 10 µm. Hierdurch wird eine höhere Trennstufenzahl erreicht als bei gewöhnlichen DC-Platten. Die Trennung des Substanzgemisches wird nach Applikation der Probe an der Startlinie durch Elution von der Schicht mit einem geeigneten Fließmittel, welches ein reines Lösungsmittel oder ein Lösungsmittelgemisch sein kann erreicht. Meist erfolgt die Trennung durch Kapillarkräfte in einer Trogkammer, es sind aber auch vertikale- und zirkulare- und nach Abdichtung auch Hochdrucktrennungen möglich. Die Trennung kann einerseits linear, das heißt mit einem einzigen Laufmittel, andererseits mit einer zweidimensionalen Entwicklung erfolgen. Dabei wird die Probe zunächst in der einen Fließrichtung getrennt. Nach der Trocknung wird dann das Fließmittel gewechselt und nach Drehung der Platte um 90° erneut getrennt. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit einer echten Gradientenentwicklung mit bis zu 25 Entwicklungszyklen. Die Identifizierung der Substanzen erfolgt unspezifisch mittels Detektion durch Eigenfarbe, Bestrahlung durch UV-Licht, native Fluoreszenz oder spezifisch durch prä- oder postchromatographische Reaktionen und photometrische Messungen sowie schließlich durch die Laufhöhe, bzw. den R_F -Wert als mehr oder weniger charakteristische Stoffgröße. Der R_F -Wert ergibt sich als Quotient aus dem Abstand des Fleckmittelpunkts vom Start und dem Abstand der Fließmittelfront vom Start und wird durch Multiplikation mit 100 zum hR_F -Wert. Die Reproduzierbarkeit des R_F -Wertes hängt von vielen Einflußgrößen (z.B. Temperatur, Substanzkonzentration, Kammergröße, u.s.w.) ab (Geiss, 1987). Die Standardisierung des Verfahrens konnte

deutlich durch die Einführung des korrigierten R_f -Wertes (hR_f^c -Wert) verbessert werden (Galanos und Kapoulas, 1964; De Zeeuw *et al.*, 1978). Mittels drei oder vier mitlaufenden Referenzsubstanzen wird ein Mehrpunktkorrekturgraph ermittelt. Aus diesem kann der hR_f^c -Wert einer unbekannten Substanz graphisch ermittelt werden. Die rechnerische Ermittlung (Galanos und Kapoulas, 1964; De Zeeuw *et al.*, 1978) ist mit folgender Formel möglich:

$$R_f^c(X) = \frac{\Delta^c}{\Delta} \{R_f(X) - R_f(A)\} + R_f^c(A)$$

$R_f^c(X)$ = korrigierter R_f -Wert der unbekannten Substanz

$R_f(X)$ = gemessener R_f -Wert der unbekannten Substanz

Δ^c = $R_f^c(B) - R_f^c(A)$; Differenz der korrigierten R_f -Werte des Referenzsubstanzenpaares

Δ = $R_f(B) - R_f(A)$; Differenz der gemessenen R_f -Werte des Referenzsubstanzenpaares

$R_f^c(B)$, $R_f^c(A)$ = korrigierte R_f -Werte der Referenzsubstanzen

$R_f(B)$, $R_f(A)$ = gemessene R_f -Werte der Referenzsubstanzen

A = Referenzsubstanz, die am nächsten unterhalb der unbekannten Substanz liegt

(liegt die unbekannte Substanz zwischen dem Startpunkt und der untersten

Referenzsubstanz, so ist der Startpunkt ($R_f^c=0$) als A zu betrachten)

B = Referenzsubstanz, die am nächsten oberhalb der unbekannten Substanz liegt (liegt

die unbekannte Substanz zwischen der obersten Referenzsubstanz und der

Fließmittelfront, so ist diese ($R_f^c=100$) als B zu betrachten)

4.1.4.2.3 CE

Das Prinzip der Kapillarelektrophorese (CE) beruht auf dem Transport der Komponenten eines Gemischs durch eine mit Pufferlösung gefüllte Kapillare, an der eine Gleichstrom-Hochspannung (20-30 kV, 200- 250 μ A) angelegt wird. Bei den Kapillaren kommen die in der Gaschromatographie verwendeten Quarzkapillaren in Frage, sie haben meist einen Innendurchmesser von 75 μ m und eine Länge von 20- 100 cm. Bei einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 μ m und einer Länge von 100 cm beträgt das Innenvolumen ca. 5 μ l. Um eine Überladung zu vermeiden liegt das

Probenvolumen daher im Nanoliterbereich. Der durch die große Länge und den geringen Querschnitt außergewöhnliche hohe elektrische Widerstand bewirkt, daß nur sehr wenig Wärme während des Trennvorgangs freigesetzt wird. Außerdem kann entstehende thermische Energie auch noch über die große Oberfläche der Kapillare rasch an die Umgebung abgegeben werden. Die elektrophoretische Trennung beruht auf der unterschiedlichen Beweglichkeit von gelösten Substanzen. Die Beweglichkeit nimmt mit der Ladung der Teilchen zu und mit höherer Molekülgröße sowie Viskosität des Mediums ab. Die Geschwindigkeit des Flusses hängt ebenfalls von der Ladung ab. Negativ geladene Moleküle fließen langsamer, als der elektroosmotische Fluß zur negativen Elektrode oder sogar in die entgegengesetzte Richtung zurück zur positiven Elektrode. Positiv geladene Moleküle fließen aufgrund ihrer Anziehung schneller als der elektroosmotische Fluß zur negativen Elektrode, ungeladene Teilchen bewegen sich mit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses und werden daher in der Regel kaum aufgetrennt. Die Kapillarelektrophorese stellt eine Verbindung der Vorzüge der HPLC und der Elektrophorese dar. Zur Detektion können alle in der HPLC geläufigen Detektoren eingesetzt werden (Skoog und Leary, 1996; Pühler *et al.*, 1999).

4.1.4.2.4 GC/MS

Siehe 2.2.2 und 2.2.4

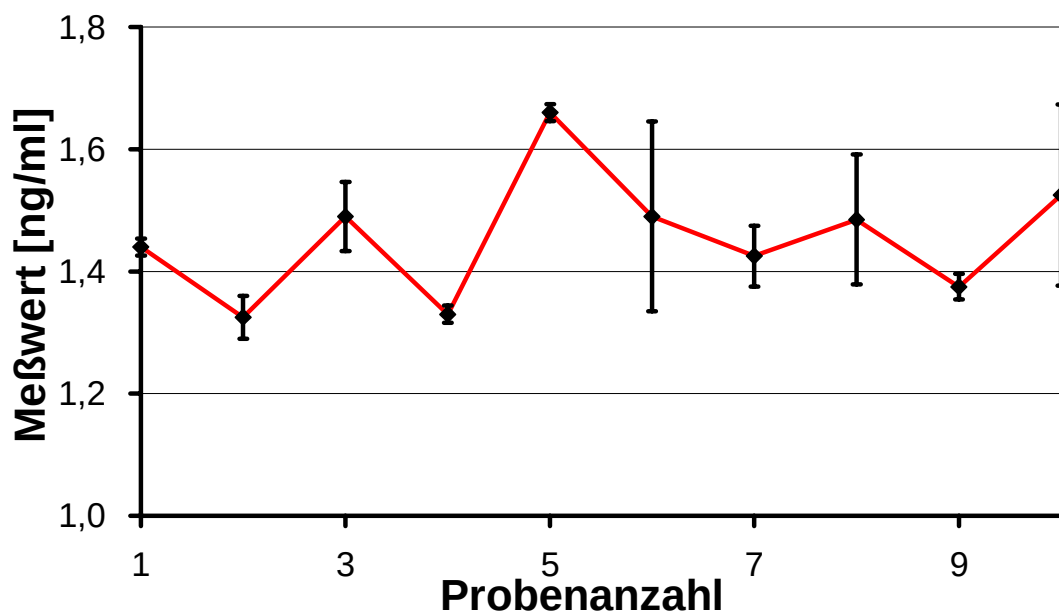
4.1.4.2.5 Fluoreszenzdetektion

Bei den oben genannten Verfahren sind unterschiedliche Detektionsverfahren möglich, die die stoffspezifischen, physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen erfassen. In der HPLC werden am häufigsten UV-, Fluoreszenz- und elektrochemische sowie seit neuerem auch massenselektive Detektoren verwendet. Bezüglich der Erfassung kleinster LSD-Mengen in Proben hat der Einsatz der Fluoreszenzdetektion aufgrund der hohen Empfindlichkeit gute Erfolge gezeigt. Mit der Fluoreszenzdetektion können Substanzen erfaßt werden, die wie LSD eine ausreichende native Fluoreszenz zeigen oder Substanzen, die mittels einer geeigneten Derivatisierung in eine fluoreszierende Substanz umgewandelt werden können. Die durch Einstrahlung von UV- Licht (Absorption) angeregte Substanz emittiert längerwelliges Licht (Emission). Die erzeugte Fluoreszenz wird in einem Winkel von 90° gemessen (Unger, 1989).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Bestimmung der Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde zweimal die 10-fache Messung einer Probe mit bekannter LSD-Konzentration durchgeführt. Die Darstellung des Ergebnisses erfolgt durch Mittelwerte und Standardabweichung. Es ergab sich im Mittel ein Variationskoeffizient von 7,87 %.



Reihe	n	$x_{\max}$ [ng/ml]	$x_{\min}$ [ng/ml]	VK [%]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung [ng/ml]
1	10	1,67	1,34	7,256	1,44	0,104
2	10	1,65	1,30	8,492	1,47	0,124

Abbildung 19

Bestimmung der Präzision in der Serie

4.2.2 Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

Die Messungen zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag erfolgten mittels zweier kommerzieller Kontrollen über den Zeitraum von 18 Tagen. Dabei wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Für Konzentrationen im mittleren Bereich ergab sich hierbei ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 13,55 %, für niedrigere von 9,977 %.

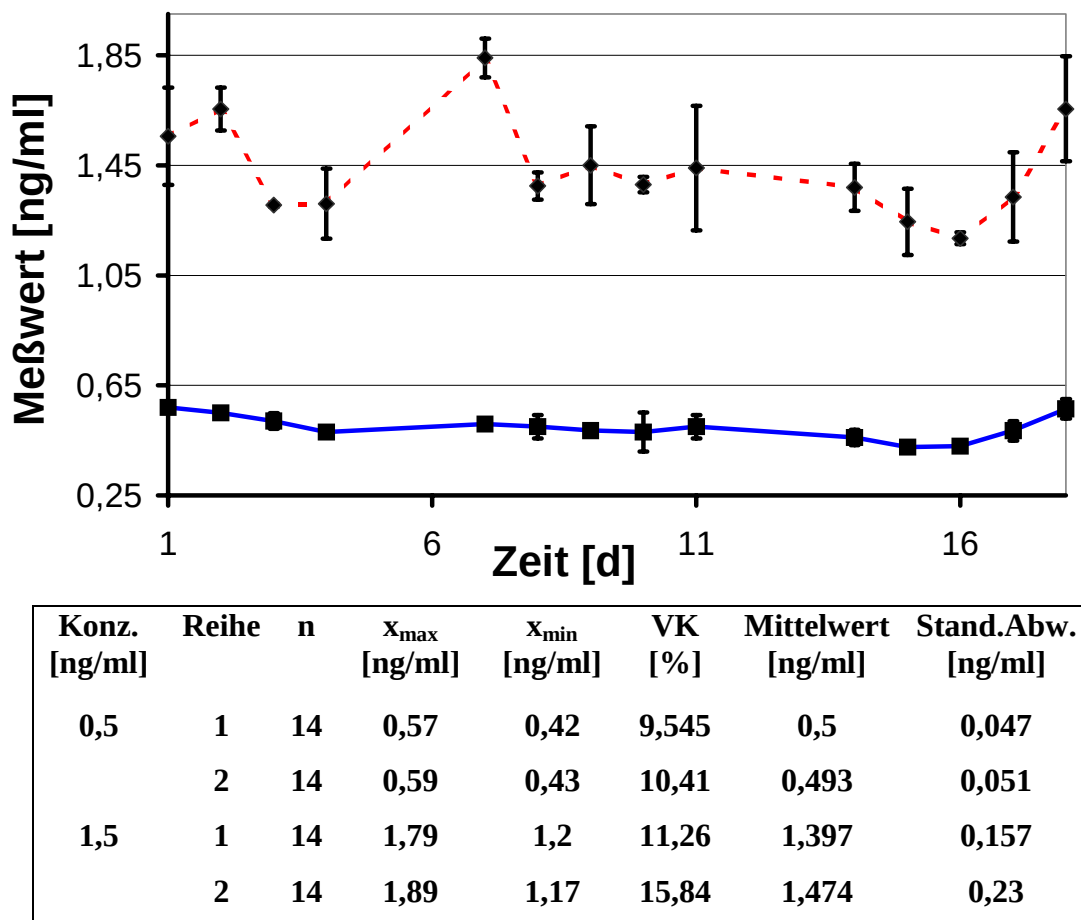


Abbildung 20

Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

(gestrichelte Linie entspricht der Probe mit mittlerer LSD-Konzentration; durchgezogene Linie entspricht der Probe mit niedrigerer LSD-Konzentration)

4.2.3 Meßgenauigkeit in hohen und niedrigen Konzentrationsbereichen

Für diese Bestimmung wurde eine Stammlösung aus mehrfach negativ getestetem Humanurin und einer methanolischen LSD-Lösung der Firma Promochem hergestellt. Die verschiedenen Konzentrationen wurden durch weitere Verdünnung der Stammlösung mit Leerurin erhalten. Die erheblichen Schwankungen der Meßwerte in oberen Konzentrationsbereichen werden deutlich.

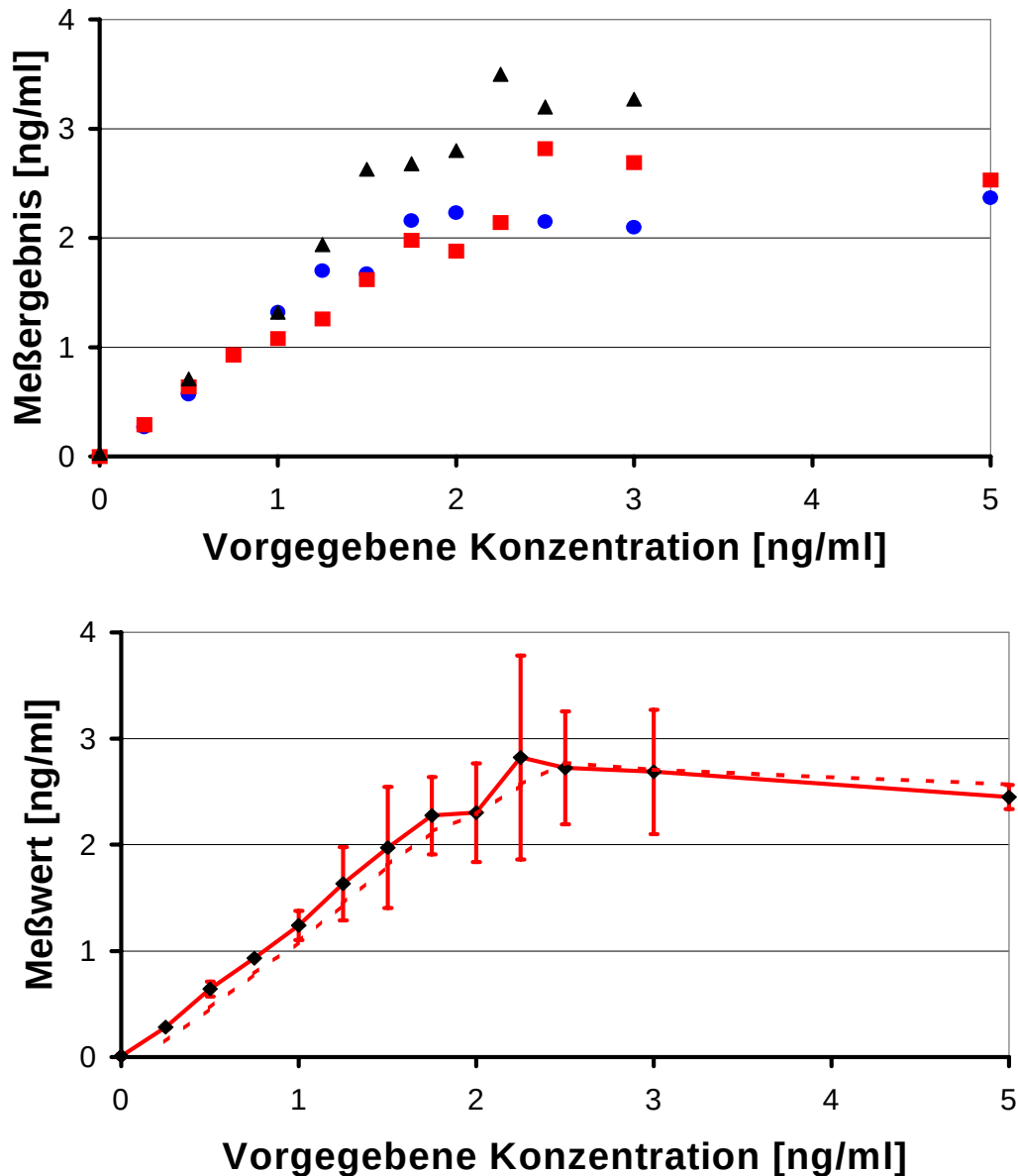
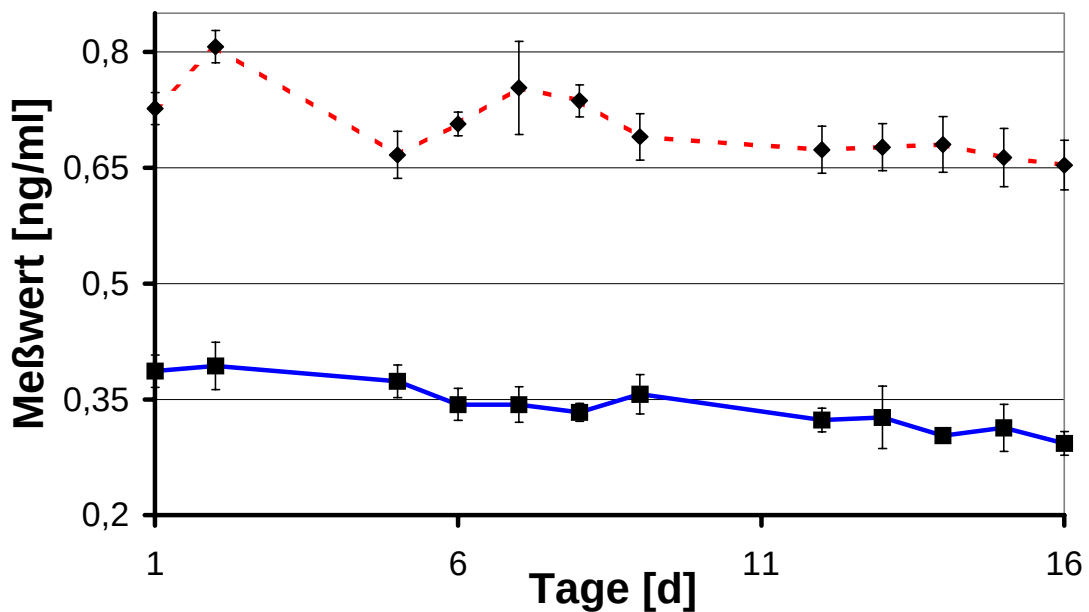


Abbildung 21

Streubreite bei Messung niedriger und hoher LSD-Konzentrationen mit drei unabhängigen Meßreihen. In der oberen Abbildung sind die Einzelwerte als Punktwolke dargestellt, in der unteren Abbildung als Mittelwerte und Standardabweichung.

4.2.4 Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagenzien

Die Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmungen über einen Zeitraum von 16 Tagen ohne zwischenzeitliches Kalibrieren durchgeführt. Hierzu wurden eine über- und eine unter dem Cutoff liegenden Kontrolle der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Die Meßwerte blieben über einen Zeitraum von 14 Tagen stabil. Gegen Ende des erfaßten Zeitraums sanken die Meßwerte etwas ab.



Konz. [ng/ml]	Reihe	n	x _{max} [ng/ml]	x _{min} [ng/ml]	VK [%]	Mittelwert [ng/ml]	Stand.Abw. [ng/ml]
0,3	1	12	0,4	0,3	8,54	0,34	0,029
	2	12	0,42	0,29	12,135	0,347	0,042
	3	12	0,39	0,28	11,73	0,334	0,039
0,7	1	12	0,83	0,62	8,33	0,69	0,058
	2	12	0,79	0,63	6,44	0,71	0,046
	3	12	0,8	0,64	7,58	0,705	0,054

Abbildung 22

Prüfung der Kalibrationsstabilität der Boehringer Mannheim Reagenzien mit einer LSD-Kontrolle über (gestrichelte Linie) und einer LSD-Kontrolle unter (durchgezogene Linie) dem Cutoff

4.2.5 Kreuzreaktivität verschiedener Substanzen mit dem CEDIA® DAU LSD von Boehringer Mannheim

Die unten angegebenen Konzentrationen wurden mit mehrfach negativ getestetem Humanurin und den einzelnen Reinsubstanzen hergestellt. Die Messungen wurden jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für die Untersuchung nicht strukturell verwandter Substanzen standen teilweise außerdem Urine von Personen zur Verfügung, die mit diesen Medikamenten behandelt wurden.

Mit LSD strukturell verwandte Substanzen

Substanz	Untersuchte Konzentration [ng/ml]	Kreuzreaktivität [%]
<u>LSD</u>	3	100
<u>Nor-LSD</u>	500	0
	1000	0,12
	2000	0,069
<u>Bufotenin</u>	50000	0,000066
	100000	0,000024
	50000	0,0017
<u>Ergometrin</u>	5000	0,0062
	10000	0,0053
	50000	0,0021
<u>Ergocryptin</u>	10000	0
	100000	0
<u>Ergocristin</u>	10000	0
	100000	0
<u>Harmin</u>	50000	0,00003
	100000	0
<u>Methysergid</u>	5000	0,0038
	10000	0,0038
	50000	0,0018
<u>N,N-Dimethyltryptamin</u>	50000	0,000141
	100000	0,000131
<u>Serotonin</u>	50000	0,00006
	100000	0

Abbildung 23

Untersuchung zur Kreuzreaktivität von mit LSD strukturell verwandten Substanzen mit dem CEDIA® DAU
LSD von Boehringer Mannheim

Mit LSD nicht strukturell verwandte Substanzen

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u> [ng/ml]	<u>Kreuzreaktivität</u> [%]	<u>Urin-Konz</u> <u>in tödlichen</u> <u>Fällen [ng/ml]</u>	<u>Metabolite in</u> <u>Urinen üblicher</u> <u>Tagesdosis</u> [ng/ml]
<u>Allopurinol</u>	50000	0		
<u>Ambroxol</u>	1000	0,031		1,87 ; 1,04
	10000	0,0098		
<u>Bromhexin</u>	1000	0,006		
	10000	0,0027		
<u>Clozapin</u>	10000	0	11000	0,03
	50000	0,000032		
<u>Clozapin-N-oxid</u>	10000	0		
	50000	0		
<u>Nor-Clozapin</u>	10000	0		
	50000	0		
<u>Diltiazem</u>	50000	0,0001	33000	
<u>Dopamin</u>	50000	0		
<u>Doxepin</u>	50000	0,00007	7500	0
<u>Ethosuximid</u>	50000	0	120000	
	300000	0		
<u>Glibenclamid</u>	50000	0		
<u>Haloperidol</u>	5000	0,0057	6600	0,03
	10000	0,0048		
	50000	0,0021		
<u>Metamizol</u>	10000	0		
	50000	0		
<u>4-Aminophenazon</u>	10000	0		
	50000	0		
<u>Metoclopramid</u>	10000	0,0005		0,08
	50000	0,0049		
<u>Metoprolol</u>	50000	0	66000	0
	200000	0,000046		
<u>Oxazepam</u>	50000	0	13000	0
<u>Phenytoin</u>	50000	0	<5000	
<u>Promethazin</u>	50000	0,00002	10000	
<u>Tramadol</u>	50000	0		
<u>Trimipramin</u>	50000	0		0,09
<u>Verapamil</u>	50000	0		
<u>Zolpidem</u>	50000	0		0

Abbildung 24

Untersuchung zur Kreuzreaktivität von mit LSD nicht strukturell verwandten Substanzen mit dem CEDIA® DAU LSD von Boehringer Mannheim

4.2.6 Vergleich der CEDIA®-Methode und der EMIT®-Methode

Die auf dem Cobas Mira allesamt positiv ermittelten und anonymisierten Primärdaten stellte uns freundlicherweise das psychiatrische Krankenhaus Hadamar zur Verfügung. Die Ergebnisse konnten größtenteils auf dem BM Hitachi 902 nicht bestätigt werden. Die Proben wurden sowohl mit der CEDIA®-Methode als auch gaschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß alle auf dem BM Hitachi 902 positiv gemessenen Proben das Mukolytikum Ambroxol enthielten. Außerdem wurden auch noch weitere Substanzen in den Proben gefunden.

Vergleich von LSD-Bestimmung mit der CEDIA-Methode (Boehringer Mannheim) und der EMIT-Methode

<u>Probennr.</u>	<u>Cobas Mira</u> Meßwert [ng/ml]	<u>Hitachi 902</u> Meßwert [ng/ml]	<u>GC/MS</u> andere Substanzen
1	1,00	0,23	Carbamazepin
2	0,75	0,04	
3	0,72	0,06	
4	1,56	0,04	Metamizol
5	1,02	0,04	
6	0,98	0,00	
7	0,57	0,06	
8	1,40	0,00	
9	1,09	0,20	
10	1,41	0,00	Metamizol
11	2,09	0,42	Ambroxol
12	0,78	0,00	Methadon
13	1,11	0,06	Methadon
14	0,73	0,00	
15	1,67	1,01	Ambroxol
16	2,22	0,25	Ambroxol
17	1,94	1,13	Ambroxol
18	1,54	0,60	Ambroxol
19	1,46	0,00	
20	0,86	0,00	
21	0,96	0,14	Ambroxol

Abbildung 25

Vergleich der EMIT®- und der CEDIA®-Methode; als positiv sind Werte ab 0,5 ng/ml zu interpretieren. Die Proben wurden mit GC/MS auf weitere Substanzen untersucht.

4.2.7 Stabilität von LSD unter verschiedenen Bedingungen

Es wurde der Einfluß von sichtbarem Licht, der Temperaturverhältnisse, der Silanisierung und des Behältermaterials untersucht. Die Stammlösung wurde aus mehrfach negativ getestetem Humanurin und einer methanolischen LSD-Lösung von Promochem hergestellt. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen bei zweiseitiger Fragestellung. Bei $\alpha < 0,1$ wird von einem schwach signifikanten Ergebnis gesprochen, bei $\alpha < 0,002$ wird das Ergebnis als hochsignifikant bezeichnet.

4.2.7.1 Einfluß der Lichtverhältnisse

Ein Teil der Stammlösung wurde auf ein weißes und ein braunes Laborglasfläschen (silanisiert) aufgeteilt. Letzteres wurde außerdem in lichtundurchlässiger Folie eingewickelt. Um einen zusätzlichen Substanzverlust durch Temperatureinflüsse zu vermeiden, wurden die Probenfläschchen im Winter bei Temperaturen von 0-4°C auf

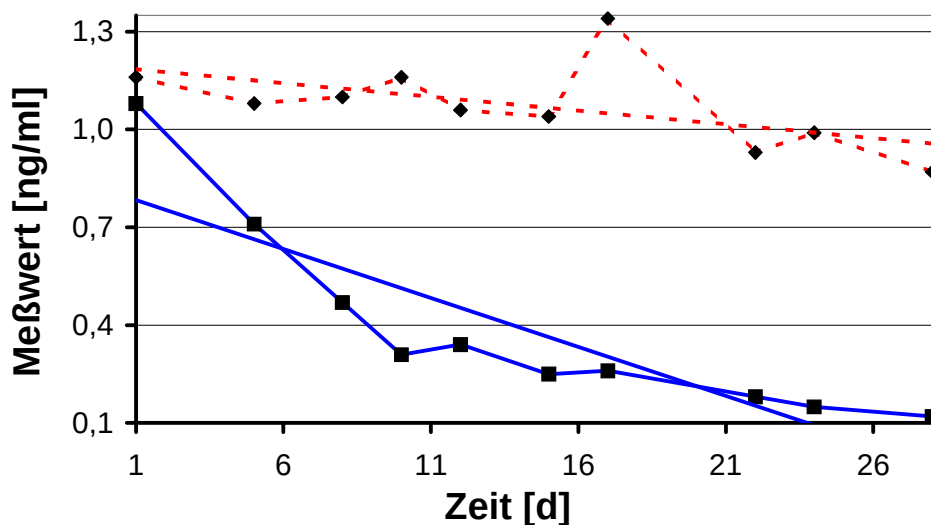


Abbildung 26

Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen

(gestrichelte Linie entspricht der lichtgeschützten Probe; durchgezogene Linie entspricht der dem Tageslicht ausgesetzten Probe; die beiden Geraden stellen die zugehörigen Trendlinien dar)

dem Fensterbrett indirektem Tageslicht (ohne direkte Sonneneinstrahlung) ausgesetzt. Der Abfall der LSD-Konzentration unter dem Einfluß von Tageslicht war mit einem Testwert von 0 hochsignifikant. Ein zusätzlicher Substanzverlust durch den Einfluß von

UV-Licht ist nicht möglich, da dieses das Glas der verwendeten Laborflaschen nicht durchdringen kann (Neumüller, 1977).

4.2.7.2 Einfluß der Temperatur

Beide silanisierten Probenfläschchen wurden gegen Lichteinflüsse geschützt. Eines wurde im Kühlschrank, das andere bei Raumtemperatur gelagert. Auch bei diesem Versuch kam es zu einem hochsignifikanten Abfall der LSD-Konzentration der Probe, die der Raumtemperatur ausgesetzt gewesen war ($t=0$).

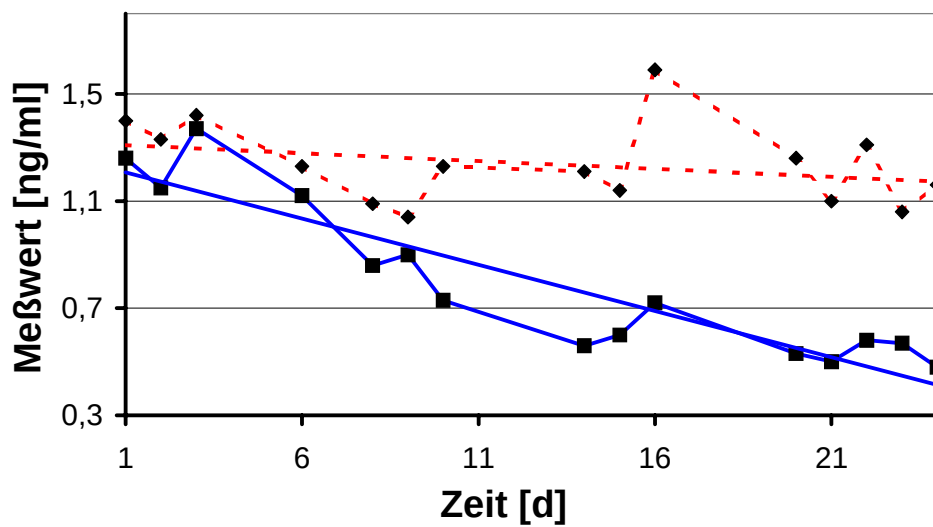


Abbildung 27

Temperaturabhängigkeit

(gestrichelte Linie entspricht der gekühlten Probe; durchgezogene Linie entspricht der der Raumtemperatur ausgesetzten Probe; die beiden Geraden stellen die zugehörigen Trendlinien dar)

4.2.7.3 Einfluß des Materials des Behältnisses

Für diesen Versuch wurde ein Probenbehältnis aus Polypropylen und ein silanisiertes Laborglasfläschchen gewählt. Die Gefäße wurden mit lichtundurchlässiger Folie eingewickelt und im Kühlschrank gelagert. Bei diesem Experiment ergab sich mit einem Testwert von 24 kein signifikanter LSD-Konzentrationsabfall gegenüber dem Polypropylen. Das bedeutet, daß Polypropylenflaschen gegenüber silanisierten Glasflaschen keinen Nachteil haben.

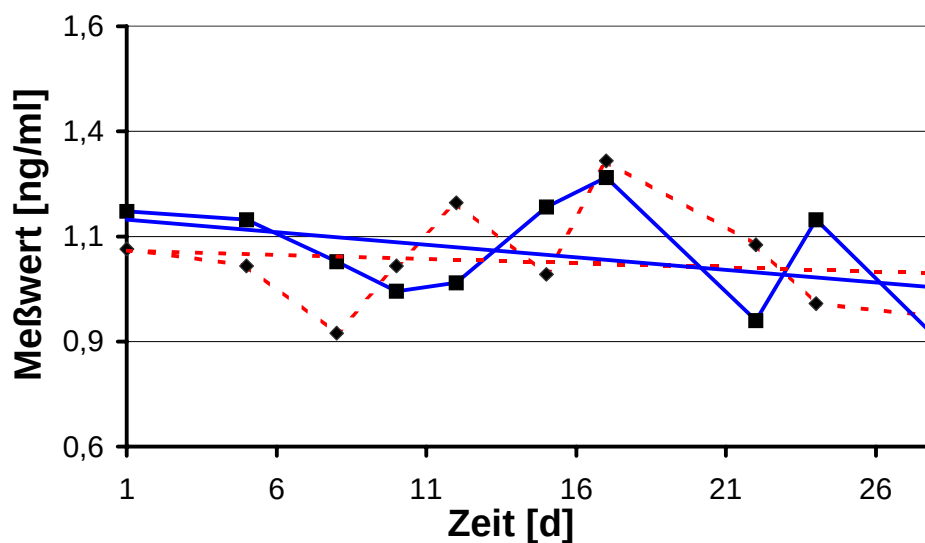


Abbildung 28

Materialabhängigkeit: Vergleich von Polypropylenflaschen und silanisierten Glasflaschen
(gestrichelte Linie entspricht der Probe in der silanisierten Glasflasche; durchgezogene Linie entspricht der Probe in der Polypropylenflasche; die beiden Geraden stellen die zugehörigen Trendlinien dar)

4.2.7.4 Einfluß der Silanisierung

Beide Laborglasfläschchen wurden gegen Licht- und Temperatureinflüsse geschützt. Ein Gläschen wurde nicht silanisiert. Es ergab sich ein Testwert von 9, das heißt, einen schwach signifikanten Konzentrationsabfall der Probe in dem nicht silanierten Fläschchen. Aus beiden Kurven lassen sich Trendlinien ermitteln. Bei diesen fällt eine konstante Differenz über den gesamten Untersuchungszeitraum auf, die die Vermutung zuläßt, daß es bereits von Anfang an zu einem Konzentrationsabfall in dem nicht silanierten Gläschen gekommen sein könnte. Dies ließe sich dadurch erklären, daß LSD sich an die freien Gruppen nicht silanierter Glaswände bindet, was einen initialen Konzentrationsabfall bewirken würde. Dieser würde nur solange fortschreiten, bis alle freien Gruppen besetzt wären, bzw. fände nicht statt, wenn die reaktiven Gruppen vorher mit Silylgruppen besetzt worden wären.

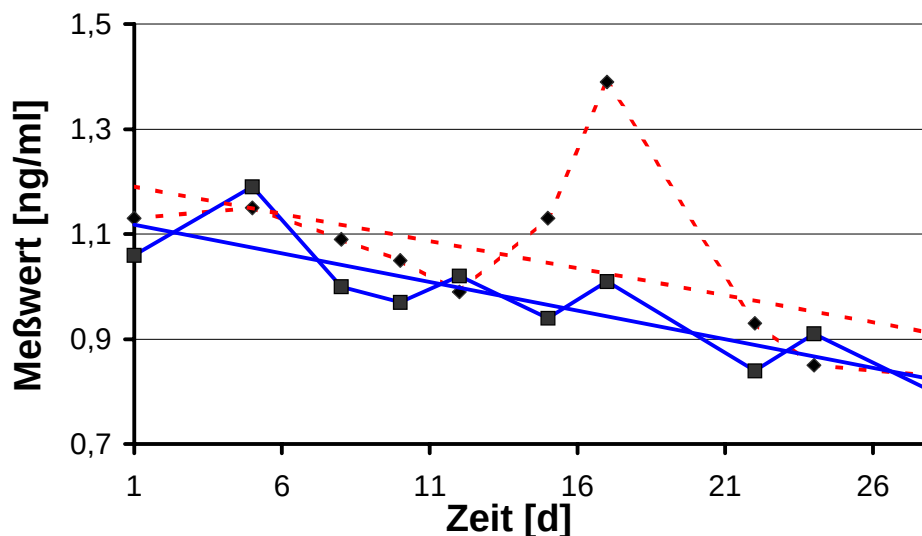


Abbildung 29

Abhängigkeit von der Silanisierung

(gestrichelte Linie entspricht der Probe in der silanierten Glasflasche; durchgezogene Linie entspricht der Probe in der nicht silanierten Glasflasche; die beiden Geraden stellen die zugehörigen Trendlinien dar)

4.3 Diskussion

Grundsätzlich werden für die Detektion von LSD Screeningmethoden und Bestätigungsanalysen unterschieden. Screeningmethoden zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus, die optimalerweise das Problem falsch-negativer Resultate gar nicht zuläßt, dabei aber möglichst wenig falsch-positive Ergebnisse produziert. Bestätigungsanalysen dagegen sollen eine so hohe Spezifität besitzen, daß falsch-positive Ergebnisse nicht vorkommen, aber noch empfindlich genug sein, um einen möglichst großen Teil der tatsächlich positiven Proben auch herauszufinden.

Ziel der Arbeit ist es einerseits durch eigene Untersuchungen, andererseits durch Informationen aus der Literatur die unterschiedlichen Methoden einander gegenüberzustellen, miteinander zu vergleichen und Vorteile sowie Nachteile der einzelnen Verfahren aufzuzeigen.

4.3.1 Screeningmethoden

Auf dem Markt sind radioaktive und nichtradioaktive immunochemische Nachweismethoden verschiedener Hersteller und unterschiedlicher Testprinzipien (CEDIA[®], EMIT[®], KIMS[®]) erhältlich. Webb *et al.* sehen außerdem HPLC mit Fluoreszenzdetektion als geeignete Screeningmethode, nicht jedoch als Bestätigungsanalyse an. Diese Ansicht, die durch die geringere Spezifität der Methode gegenüber HPLC/MS bzw. GC/MS begründet wird, teilen auch andere Autoren (Lim *et al.*, 1988). Trotzdem wird die Methode teilweise als Bestätigungsanalyse genutzt und deshalb auch mit den anderen Bestätigungsanalysen besprochen.

4.3.1.1 Nichtradioaktive Immunoassays

Die beschriebenen Immunoassays können alle automatisiert und in der Regel mit einem hohen Probendurchsatz bei geringem Zeitaufwand analysiert werden. In der Spezifität steht jeder dieser Immunoassays hinter den Radioimmunoassays zurück, eine hohe Sensitivität wird aber ebenfalls geboten. In der Literatur ist lediglich ein falsch-negatives Ergebnis mit dem CEDIA[®] DAU LSD beschrieben worden. Die untersuchte Probe enthielt in der Bestätigungsanalyse allerdings auch nur 0,26 ng/ml, der mit der CEDIA[®]-Methode erhaltene Meßwert wurde mit 0,39 ng/ml Meßwert angegeben (Verstraete *et al.*, 1998). Für die Laboratorien, denen die Anforderungen, die der Betrieb einer RIA- Methode erfordert zu aufwendig sind, bieten die nichtisotopischen Immunoassays eine zufriedenstellende Alternative. Der EMIT[®] II LSD zeigt in

unterschiedlichen Untersuchungen größere Probleme bezüglich falsch-positiver Resultate. Ursächlich sind Kreuzreaktivitäten mit verschiedenen Medikamenten (diverse Antidepressiva, diverse Neuroleptika, aber auch andere häufig angewendete Substanzen wie Metoclopramid, Labetolol und Verapamil (Meyer *et al.*, 1996; Ritter *et al.*, 1997)), insbesondere solchen, die gehäuft in der Psychotherapie und damit auch im Maßregelvollzug Anwendung finden. Da im Maßregelvollzug regelmäßig Drogenscreening durchgeführt wird, kann es hierbei leicht zu Interferenzen kommen. Ziel unserer Untersuchungen war -unter anderem- herauszufinden, ob der CEDIA® DAU LSD zum LSD-Screening den Anforderungen eines forensisch-toxikologischen Labors genügt. Die ermittelten Präzisionsdaten (siehe Tabelle) liegen innerhalb der Forderungen für forensische Fragestellungen. Bei der CEDIA®- Methode ist die Präzision des Assays bei geringeren Konzentrationen -also in dem Bereich, der beim LSD-Nachweis von besonderem Interesse ist- höher als bei größeren Konzentrationen. Die Untersuchung zur Meßgenauigkeit in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zeigt, daß im Subnanogramm-Bereich nur sehr geringe Abweichungen vorhanden sind. In diesem Bereich sind also sehr präzise Ergebnisse zu erwarten.

Daher kann es auch sinnvoll sein, ein Resultat, das mit seinem Meßwert knapp unter dem Cutoff liegt, weiter zu verfolgen. Die Stabilität der CEDIA®-Reagenzien ist ebenfalls zufriedenstellend. Es zeigt sich, daß nach etwa zwei Wochen eine Verschlechterung der Präzision sowie ein Drift zu niedrigeren Meßergebnissen eintritt. Während der Laborroutine in den darauffolgenden Monaten zeigte sich allerdings, daß eine größere Konstanz der Meßergebnisse bei wahrscheinlich stabileren Gerätebedingungen auch über einen wesentlich längeren Zeitraum zu erreichen war. Eine Kalibration ist daher alle zwei bis drei Wochen, bzw. je nach Kontrollen zu empfehlen. Die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität ergaben Interferenzen der Methode mit verschiedenen, sowohl strukturell mit LSD verwandten, als auch strukturell nicht mit LSD verwandten Substanzen. In der Praxis führten alle bis auf Ambroxol zu keinen falsch-positiven Ergebnissen. Die Kreuzreaktivität zu Ambroxol ist zwar nicht besonders hoch (abhängig von der Konzentration 0,01-0,03%), es wird aber in so hohen therapeutischen Dosen eingesetzt, daß dennoch falsch-positive Ergebnisse auftreten. Besonders problematisch bei der Kreuzreaktivität mit dieser Substanz ist die Tatsache, daß es sich bei Ambroxol (Mucosolvan®) um ein rezeptfrei erhältliches Mucolyticum handelt, das bei Erkältungskrankheiten sehr häufig eingesetzt

wird (Röhrich *et al.*, 1998). Bei der Messung einer Reihe von Proben, die mit der EMIT[®]-Methode zu falsch-positiven Resultaten geführt hatten, enthielten die drei Proben (von einundzwanzig), die auch mit der CEDIA[®]-Methode falsch-positive Ergebnisse lieferten alle Ambroxol, desweiteren mehrere Proben, deren Meßwerte zwar unter dem Cutoff lagen, aber gegenüber dem von Leerurinen erhöht waren. Glücklicherweise läßt sich Ambroxol mit einem GC/MS-Scan ohne weiteres nachweisen (siehe Anhang), so daß man bei vielen falsch-positiven Ergebnissen zumindestens einen Hinweis auf die Ursache der Interferenz bekommen kann. Ähnlich spezifisch wie der CEDIA[®] DAU LSD ist der Abuscreen[®] OnLine LSD von Roche, dieser Test weist außerdem sehr gute Präzisionsdaten auf. Dieser Test kann genau wie der CEDIA[®] DAU LSD auf den vollautomatischen Analysengeräten von Hitachi durchgeführt werden. Das erhaltene Meßergebnis ist qualitativer Natur, das heißt, es wird lediglich zwischen positiven und negativen Ergebnissen unterschieden (Mc Nally *et al.*, 1996). Der_Microplate EIA von Cozard Bioscience ist weniger spezifisch als die anderen Untersuchungsverfahren. Er kann manuell oder vollautomatisch durchgeführt werden, ist dafür aber auch zeitaufwendiger als die anderen Immunoassays. Daher scheint er weniger geeignet für den Laboralltag als der CEDIA[®] DAU LSD oder der Abuscreen[®] OnLine LSD. Die nachfolgende Tabelle bietet eine Übersicht über die beschriebenen Verfahren.

Verfahren	<u>Abuscreen®</u> <u>OnLine LSD</u> Roche Diagnostics (KIMS)	<u>CEDIA® DAU LSD</u> Boehringer Mannheim (CEDIA)	<u>EMIT® II LSD</u> Syva Co./Behring (EMIT)	<u>Microplate EIA</u> Cozard Bioscience STC Diagnostics
Cutoff	0,5 ng/ml nur qualitative Meßergebnisse	0,5 ng/ml semiquantitative Meßergebnisse	0,5 ng/ml	0,5 ng/ml
Intrapräzision	VK < 2,5% (gemessene Konzentrationen: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ng/ml) (Mc Nally et al., 1996) VK < 5% (Li et al., 1997)	VK 10,9-12,2% (Wu et al., 1997) VK 6,2-11,2% (Verstraete et al., 1998) VK 7,9% (Wölfel et al., 1998) VK 2,9-3,8% (Meyer et al., 1996)	VK 6,3-10% (Gemessene Konzentr.: 0,3; 1,0 ng/ml) (Meyer et al., 1996)	VK 5,2-6,6% (Gemessene Konzentr.: 0,375; 0,5; 0,625 ng/ml) (Cassels und Craston, 1996)
Interpräzision	VK < 3% (gemessene Konzentrationen: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ng/ml) (Mc Nally et al., 1996) VK < 5% (Li et al., 1997)	VK 13,8-22,8% (Wu et al., 1997) VK 8,6-12,6% (Verstraete et al., 1998) VK 10-13,5% (Wölfel et al., 1998) VK 6,9-15,6% (Meyer et al., 1996)	VK 15,6-18,8% (Gemessene Konzentr.: 0,3; 1,0 ng/ml) (Meyer et al., 1996)	VK 5,2-6,6% (Gemessene Konzentr.: 0,375; 0,5; 0,625 ng/ml) (Cassels und Craston, 1996)
Sensitivität/ Spezifität	1000 Proben 7 falsch-positive Ergebnisse (99,3%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Li et al., 1997) Von 28 Proben 6 falsch-positive Ergebnisse (78,5%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Cody et al., 1997)	2259 Proben, 14 falsch-positive Ergebnisse (99,4%), keine falsch-negati- ven Ergebnisse (Wu et al., 1997) Von 318 Proben ein falsch-negatives Ergebnis (Verstraete et al., 1998) 28 Proben, 4 falsch- positive (85%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Cody et al., 1997)	1898 Proben ca. 80 falsch-positive Ergebnisse (95,8%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Ritter et al., 1997) Von 28 Proben 4 falsch-positive Ergebnisse (85%), keine falsch- negativen Ergebnisse (Cody et al., 1997)	28 Proben, 6 falsch-positive Ergebnisse (78,5%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Cody et al., 1997)

4.3.1.2 Radioimmunoassays

Die Testergebnisse der Radioimmunoassays und Bestätigungsanalysen zeigen die besten Übereinstimmungen. Insbesondere der Coat A Count[®] LSD RIA zeigt eine sehr niedrige Rate für falsch-positive Testergebnisse (Cody *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997) und außerdem auch bei Proben von Serum, hämolytischem Vollblut und Mageninhalt befriedigende Präzision (Altunkaya *et al.*, 1990). Der Abuscreen[®] LSD RIA schneidet in dieser Hinsicht zwar schlechter ab, ist den nicht radioaktiven Immunoassays aber ebenfalls überlegen (Cody *et al.*, 1997). Nachteilig bei beiden Assays ist die Notwendigkeit der Einhaltung bestimmter Sicherheitsvorschriften im Labor, die kostspielige Entsorgung des radioaktiven Abfalls sowie die gegenüber nichtisotopischen Assays relativ geringe Lebensdauer der Reagenzien. Es bleibt abzuwarten, inwieweit nichtisotopische Immunoassays sich im Rahmen der besseren Erkenntnisse über den LSD-Metabolismus als empfindlicher in der Erfassung von LSD-Metaboliten (z.B. 2-oxo-3-hydroxy-LSD) erweisen.

Verfahren	<u>Coat A Count[®] LSD RIA</u> Diagnostic Products corporation	<u>Abuscreen[®] LSD RIA</u> Roche Diagnostics
Cutoff	0,5 ng/ml	0,5 ng/ml
Intrapräzision	VK 7-12,5%, in geringeren Konzentrationen höher (gemessene Konzentrationen: 0,2; 0,4; 1,0 ng/ml)	Keine Angaben
Interpräzision	VK 6-8,5%, in geringeren Konzentrationen höher (gemessene Konzentrationen: 0,33; 0,67 ng/ml) (Altunkaya und Smith, 1990)	Keine Angaben
Sensitivität/Spezifität	Keine falsch-positiven, keine falsch-negativen Ergebnisse (Cody <i>et al.</i> , 1997) Von 2259 Proben 10 falsch-positive Ergebnisse (99,56%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Wu <i>et al.</i> , 1997)	Von 28 Proben 2 falsch-positive Ergebnisse (93%), keine falsch-negativen Ergebnisse (Cody <i>et al.</i> , 1997)

4.3.2 Bestätigungsanalysen

Die zahlreichen verschiedenen Möglichkeiten zur Durchführung einer Bestätigungsanalyse ergeben sich aus der Kombination verschiedener Trenntechniken (HPLC, HPTLC, GC, CE) mit unterschiedlichen Detektionsverfahren sowie diversen Extraktionsverfahren. Außerdem gibt es mehrere Möglichkeiten der Derivatisierung und des Einsatzes von internen Standards (Abkürzungen werden im Anhang erläutert):

Autor	Trenntechnik	Extraktions- verfahren	Wiederfindung	Erfassungs- grenze	Interner Standard
Bogusz <i>et al.</i> , 1998	HPLC/MS	SPE	80%	0,5 ng/ml	LAMPA
Cai und Henion, 1996	HPLC/MS/MS	IAE	keine Angabe	0,025 ng/ml	keine Angabe
Francis und Craston, 1996	HPLC/FD	ACU	80%	0,5 ng/ml	keine Angabe
Francom <i>et al.</i> , 1988	HPLC/FD	LLE	74%	keine Angabe	Lysergol
Harzer <i>et al.</i> , 1982	HPLC/FD	SPE	60-70%	0,5 ng/ml	Extern. Standard
Lillsunde und Korte, 1991	HPLC/FD	SPE	50%	keine Angabe	keine Angabe
Poch <i>et al.</i> , 1999	LC/MS/MS	LLE und SPE	keine Angabe	0,1 ng/ml	LAMPA
Rule und Henion, 1992	HPLC/MS	IAE	keine Angabe	0,5 ng/ml	keine Angabe
Schmidt <i>et al.</i> , 1996	HPLC/FD	LLE	keine Angabe	0,5 ng/ml	keine Angabe
Webb <i>et al.</i> , 1996	HPLC/FD HPLC/MS	IAE	keine Angabe	0,5 ng/ml	Methysergid, LAMPA

Blum <i>et al.</i> , 1990	HPTLC	LLE	keine Angabe	0,4 ng/ml	Methysergid
Cai und Henion, 1996	CE/LC/MS/MS	SPE	45-74%	0,5 ng/ml	Methysergid
Frost <i>et al.</i> , 1997	CE/LIF	LLE	60%	0,4-0,5 ng/ml	Methyl- ergometrin
Doherty, 1997	GC/MS	ohne Extraktion	/	0,25 ng/ml	LAMPA
Francom <i>et al.</i> , 1988	GC/MS	LLE	74%	0,5 ng/ml	LSD-D ₃
Hoey, 1991	GC/MS	LLE und SPE	keine Angabe	0,4 ng/ml	LAMPA
Lim <i>et al.</i> , 1988	GC/MS	LLE mit enzymatischer Hydrolyse (β - Glucuronidase)	81%	0,05 ng/ml	LSD- ² H ₁₀ , Methysergid
Musshoff <i>et al.</i> , 1997	GC/MS	LLE	76%	0,1 ng/ml	LSD-D ₃
Nelson <i>et al.</i> 1992	GC/MS/MS	LLE	65%	0,02 ng/ml	LAMPA
Papac <i>et al.</i> , 1990	GC/MS	LLE	keine Angabe	0,1 ng/ml	Methysergid, LSD- ² H ₁₀
Sun, 1997	GC/MS	ohne Extraktion	/	0,005 ng/ml	LSD-D ₃

Bei der Analyse von LSD-haltigen Proben mit HPLC besteht die einfache Handhabung der Methode. In der Trennleistung der Gaschromatographie durchaus vergleichbar bietet sie den Vorteil, daß Proben vorher weniger kompliziert aufbereitet werden müssen. Die bei der GC notwendige Derivatisierung, die einen weiteren Schritt in der Probenvorbereitung mit der Gefahr des Substanzverlusts bedeutet, fällt hier weg. Auch Metaboliten können problemlos mit MS detektiert werden (Poch *et al.*, 1999). Die

Kombination der HPLC mit Fluoreszenzdetektion als Bestätigungsanalyse wird von mehreren Labors eingesetzt (Harzer *et al.*, 1982; Francom *et al.*, 1988; Francis und Craston, 1996; Schmidt *et al.*, 1996). Die Spezifität wird aber teilweise als unzureichend bewertet (Webb *et al.*, 1996), da als einzige Anhaltspunkte Retentionszeit und ein bestimmtes Fluoreszenzverhalten dienen. Bei der massenselektiven Detektion ist die Wahrscheinlichkeit äußerst gering, daß eine andere Substanz mit derselben Retentionszeit auch das gleiche Massenspektrum aufweist. Daher wird in manchen Labors die Kombination von HPLC und Fluoreszenzdetektion lediglich als selektivere Screeningmethode angesehen, zur Bestätigungsanalyse jedoch eine Kombination mit Massenspektrometrie eingesetzt (Webb *et al.*, 1996). Die massenselektive Detektion bietet den Vorteil, daß zum einen eine hohe Spezifität erreicht wird, zum anderen bietet der SIM- Modus gegenüber dem Full Scan eine größere Empfindlichkeit mit deutlich niedrigeren Nachweisgrenzen. Verbesserung in Hinsicht auf die Selektivität ist mit dem Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie durch einen weiteren Massentrennungsschritt möglich. Hierbei können Komponenten mit unterschiedlichen Massen, aber gleicher Retentionszeit selektiert werden. Nachteilig sind hierbei höhere Kosten, außerdem ist die Bedienung schwieriger und erfordert besser ausgebildetes Personal (Webb *et al.*, 1996). Die Problematik bei der gaschromatographischen Trennung beruht vornehmlich auf den großen Substanzverlusten, die ihre Ursache in der Temperaturempfindlichkeit von LSD sowie der Adsorption von LSD am Säulenmaterial haben. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit der Derivatisierung, die für eine bessere Chromatographierbarkeit von LSD sorgt sowie Schutz vor thermischen Einflüssen bietet. Gleichzeitig bedeutet sie aber einen weiteren Arbeitsschritt mit der Gefahr des Substanzverlusts. Ohne Derivatisierung können bei der gaschromatographischen Trennung die erforderlichen niedrigen Nachweisgrenzen nicht erreicht werden (Webb *et al.*, 1996).

Die Kapillarelektrophorese ist eine erst in jüngerer Zeit verwendete Methode. In der Auflösung der Gaschromatographie gleichwertig, bietet sie den Vorteil einer sehr geringen Analysendauer von acht Minuten pro Analysengang. Für die Detektion stehen LIF sowie MS mit ausreichend niedriger Erfassungsgrenze zur Verfügung, UV-Detektion ist nicht sensitiv genug (Cai und Henion, 1996; Frost *et al.*, 1997).

Die HPTLC und TLC wurden bei der Analyse von LSD-Zubereitungen in der Vergangenheit häufig -unter anderem als Schnelltest- eingesetzt. Bei dem Nachweis von

LSD aus Körperflüssigkeiten ist der Einsatz der HPTLC allerdings selten und kann bezüglich der Erfassungsgrenze von 1 ng/ml mit den anderen Methoden auch nicht mithalten (Blum *et al.*, 1990) oder wird von vornherein nur als Screeningmethode eingesetzt (Lillsunde und Korte, 1991).

4.3.3 Präanalytik

Die Voraussetzung für den Erfolg einer Bestätigungsanalyse ist eine optimale Präanalytik. Allem voran ist die Probenaufbewahrung von Bedeutung, da LSD eine gegenüber verschiedenen Einflüssen außerordentlich empfindliche Substanz ist. In der vorliegenden Arbeit wurden alltägliche Einflüsse aus dem Routinebetrieb wie Licht, Temperatur und Adhäsion an unterschiedliche Materialien untersucht. Bei der Exposition von LSD gegenüber Tageslicht kam es zu einem exponentiellen Abfall der LSD-Konzentration. Die Aufbewahrung der Proben in lichtgeschützten Behältnissen ist daher unbedingt zu empfehlen. Allerdings ist der Substanzverlust bei geringer Intensität des Lichts (weit vom Probenaufbewahrungsort entfernte Lichtquelle) niedriger (Li *et al.*, 1998). Ein hochsignifikanter Abfall der LSD-Konzentration in Urinproben konnte außerdem bei der Exposition gegenüber Raumtemperatur festgestellt werden, so daß zumindestens eine Kühlung der Proben bei 4° Celsius, bei der die LSD-Konzentration über mindestens vier Wochen stabil ist, bei längerer Probenaufbewahrung sogar eine Tiefkühlung bei –18° Celsius zu empfehlen ist. Der Substanzverlust durch Adhäsion von LSD an nicht-silanisierten Glaswänden stellt sich als ein signifikanter, initialer Abfall der LSD-Konzentration dar, das heißt, sobald die Bindungsstellen an der Glaswand gesättigt sind, findet ein weiterer Verlust nicht statt. Eine Aufbewahrung von LSD-haltigen Urinproben in Polypropylenflaschen gegenüber silanisierten Glasflaschen hat in unseren Untersuchungen keine Nachteile gebracht, so daß davon ausgegangen werden kann, daß eine nennenswerte Adhäsion von LSD an Polypropylenoberflächen nicht stattfindet und somit eine Aufbewahrung von LSD-haltigen Urinproben in ihnen möglich ist.

Für die Aufbereitung der Proben stehen grundsätzlich verschiedene Extraktionsverfahren zur Verfügung. Am kostengünstigsten ist die Flüssigphasenextraktion. Das Problem ist hierbei den richtigen Kompromiß zwischen Reinheit des Extrakts und Wiederfindungsrate zu schließen. Je mehr Reinigungsschritte enthalten sind, desto reiner wird zwar das Extrakt, aber desto größer wird auch der Substanzverlust. Bei der Festphasenextraktion ist die Wiederfindung unter Umständen

zwar auch nicht besonders groß, in der Regel erhält man dafür aber ein vergleichsweise reines Extrakt. Höhere Kosten müssen hierbei allerdings in Kauf genommen werden. In letzter Zeit werden häufiger immunchemische Extraktionsverfahren angewendet. Diese erreichen meistens gleichzeitig hohe Wiederfindungsraten und sehr reine Extrakte, was sich auch positiv auf die Haltbarkeit der Säulen der jeweiligen Trennmethode aufweist. Bei der Kombination von HPLC und Fluoreszenzdetektion kann eine etwas bessere Spezifität erreicht werden, wenn die zu untersuchende Probe vorher mittels Immunoextraktion aufbereitet wird. Trotzdem muß auf die relativ hohen Kosten gegenüber den anderen Extraktionsverfahren hingewiesen werden (Rule und Henion, 1992; Cai und Henion, 1996; Francis und Craston, 1996; Webb *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1998;).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Alkohol- und Drogenkonsum gehören aufgrund der Konsequenzen für das soziale Umfeld und der Gefährdungsmöglichkeiten am Arbeitsplatz und im Verkehr zu den größten sozialmedizinischen Problemen. Medizinisch besonders relevant sind außerdem mögliche Intoxikationen und daraus resultierende notfallmedizinische Diagnostik und Therapie. Bei den Verfahren zur Bestimmung von Ethanol in Serum gibt es bezüglich der Präzision keine großen Unterschiede zwischen den meisten Assays. Lediglich der TD_x REA[®] Ethanol Assay liegt teilweise außerhalb des festgelegten Grenzen für forensische Fragestellungen (Alt und Reinhardt, 1996) und scheint daher im Rahmen der forensischen Toxikologie weniger gut einsetzbar zu sein als die anderen Verfahren. Die Spezifität der meisten Tests ist gut, nur der ALC Ethyl Alcohol Assay weist eine erhebliche Störanfälligkeit gegenüber 1-Propanol und 1-Butanol auf. Ebenfalls von Interesse bei der Auswahl eines Verfahrens sind Praktikabilität, Zeitaufwand, Kosten und benötigtes Probenvolumen. Am einfachsten in der Handhabung sowie am günstigsten bezüglich des Zeitaufwandes sind der EMIT[®] ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay von Syva Co./Behring und der Ethyl Alcohol Assay von Boehringer Mannheim. Sie weisen einen ausreichenden Linearitätsbereich (0,1-4 g/l) auf, so daß lediglich selten vorkommende, in der Blutalkoholkonzentration noch darüberliegende Proben verdünnt und erneut bestimmt werden müssen. Die mit diesen Assays gemessenen Werte liegen innerhalb des für forensische Zwecke geforderten Bereichs. Gemeinsam mit dem TD_x

REA[®] Ethanol Assay von Abbott sind sie auch was das benötigte Probenvolumen angeht am günstigsten. Der Vorteil der Headspace-Gaschromatographie liegt einerseits in der hohen Präzision der Methode, andererseits in der hohen Spezifität sowie der Möglichkeit der Begleitstoffanalyse. Gerade in der forensischen Toxikologie wird die Headspace-Gaschromatographie ungeachtet des relativ hohen Zeitaufwandes durch keine andere Methode zu ersetzen sein.

Aufgrund der verbesserten Spezifität (weniger falsch-positive Ergebnisse) finden Immunoassays inzwischen auch beim LSD-Screening häufige Anwendung. Ein positives Screeningresultat hat allein aber noch keinen Beweiswert und muß daher, insbesondere wenn forensische Fragestellungen vorliegen, einer Bestätigungsanalyse zugeführt werden. Häufig werden positive Screeningergebnisse jedoch falsch interpretiert oder wenig erprobte, störanfällige Verfahren zur Bestätigungsanalyse verwendet. Unsere Untersuchungen zum CEDIA[®] DAU- Test für LSD (Boehringer Mannheim) ergaben insgesamt eine geringe Störanfälligkeit dieser Methode. Bei der Bestimmung der Präzision in der Serie erhielten wir einen Variationskoeffizienten (VK) von 7,83%. Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag ergab einen VK von 9,85%-13,3%. Bei den Untersuchungen zur Spezifität fanden wir für folgende chemisch verwandte Substanzen Kreuzreaktivitäten: Nor-LSD, Ergometrin und Methysergid. Von den chemisch nicht verwandten Substanzen zeigten vor allem Ambroxol, Bromhexin, Diltiazem, Haloperidol sowie Metoclopramid Kreuzreaktivitäten. Außer Ambroxol führte jedoch keine dieser Substanzen zu Interferenzen im Sinne falsch-positiver Ergebnisse. Der Vergleich des CEDIA[®] DAU LSD mit dem EMIT[®] II LSD (Syva Co./Behring) zeigte die geringe Störanfälligkeit des CEDIA[®]- Tests. Von 21 falsch-positiven Ergebnissen des EMIT[®]- Tests fanden wir mit dem CEDIA[®]- Test nur noch 3 Proben positiv; diese enthielten alle Ambroxol. Auch in der Routinediagnostik verlief die LSD-Bestimmung weitgehend störungsfrei. Von inzwischen ca. 400 analysierten Proben erhielten wir lediglich 3 falsch-positive Ergebnisse. Bezüglich der Präzision, Spezifität und Praktikabilität ist der CEDIA[®] DAU LSD dem Abuscreen[®] OnLine LSD (Roche) in etwa gleichwertig. Der Microplate EIA von Cozard Bioscience hingegen schneidet, was die Spezifität angeht, schlechter ab. Wird der Test manuell durchgeführt (gegebenenfalls von Vorteil, wenn eine vollautomatische Durchführung einmal nicht möglich sein sollte), so ist der Aufwand für den Test entsprechend höher. Der Test kann jedoch auch vollautomatisch durchgeführt werden, allerdings ist die Analysenzeit höher

als bei den anderen Verfahren. Die radioimmunchemischen Tests sind Interferenzen gegenüber am wenigsten störanfällig. Sie bergen aber den Nachteil, daß Abfälle gesondert entsorgt werden müssen, besondere Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden müssen und die Reagenzien für die Tests schneller verfallen. Diese Schwierigkeiten bedingen auch die höheren Gesamtkosten der Radioimmunoassays.

Nur die chromatographischen Bestätigungsanalysen für den Nachweis von LSD sind so spezifisch, daß aufgrund des Drogennachweises strafrechtliche Konsequenzen möglich sind. Auf diesem Gebiet konnten in den letzten Jahren verschiedene Methoden mit ausreichender Empfindlichkeit etabliert werden. Es darf jedoch nicht vergessen werden, wie schwer der Einsatz solcher komplizierter Verfahren im Laboralltag ist. LSD ist eine außerordentlich empfindliche Substanz, die sich sowohl unter dem Einfluß von Tageslicht als auch hoher Temperaturen zersetzt. Außerdem muß insbesondere mit dem Substanzverlust durch Adsorption von LSD an der Säulenwand beim Trennvorgang gerechnet werden. Wegen der geringen Substanzmengen in der Probe muß das Extrakt häufig stark aufkonzentriert werden. Dieses führt zu der schnelleren Verschmutzung und damit einer geringeren Lebensdauer der Säule. Für die Trennung LSD-haltiger Substanzgemische eignet sich aufgrund der kalten Probenaufgabe die HPLC am besten. In Kombination mit Fluoreszenzdetektion handelt es sich hierbei zwar um eine kostengünstige und einfach zu handhabende Methode, viele Autoren betrachten sie jedoch als zu unspezifisch und lediglich zum Screening oder für nicht-forensische Zwecke geeignet. Eines der größten Probleme des LSD-Nachweises ist die äußerst geringe LSD-Konzentration in den Proben. Daher hat sich die Forschung der letzten Jahre auch darauf konzentriert, Extraktionsverfahren zu entwickeln, die die gesuchte Substanz mit möglichst hoher Ausbeute aus der störenden Probenmatrix separieren. Die immunchemischen Extraktionsverfahren sind zwar teurer, bieten aber nicht nur eine hohe Ausbeute an LSD, sondern in der Regel auch ein reineres Extrakt, als mit den herkömmlichen Verfahren (SPE, LLE) zu erreichen ist.

Unsere Erfahrungen mit dem immunchemischen Drogennachweis haben gezeigt, daß die Systeme teilweise erheblichen Qualitätsschwankungen unterliegen. Deshalb ist es besonders wichtig, die Untersuchungsergebnisse kritisch zu hinterfragen, schließlich ist der Nachweis des Drogenkonsums für den Betroffenen oftmals folgenschwer. Ziel sollte es daher sein, vertrauenswürdige, störungsarme Bestätigungsanalysen zu entwickeln und positive Screeningergebnisse in jedem Fall einer solchen Analyse zu unterziehen.

6 Literatur

Abraham, HD; Aldridge, AM; Adverse consequences of lysergic acid diethylamide; Addiction 1993 (88)10: 1327-1334

Abraham, HD; Duffy, FH; Stable quantitative EEG difference in post-LSD visual disorder by split-half analysis: evidence for disinhibition; Psychiatry Res 1996 67(3): 173-187

Abraham, HD; Fava, M; Order of onset of substance abuse and depression in a sample of depressed outpatients; Compr Psychiatry 1999 (1): 44-50

Achinger, R; Mallach, HJ; Bemerkungen über das „Resorptionsdefizit“ von Aethylalkohol; Beitr gerichtl Med 1973 (30): 1-6

Alt, A; Reinhardt, G; The accuracy of blood alcohol determination with head-space GC, ADH and REA ethanol assay for the AXSYM system- a comparison of the methods; Blutalkohol 1996; 33(4): 209-214

Altunkaya, D; Smith, RN; Evaluation of a commercial radioimmunoassay kit for the detection of lysergide (LSD) in serum, whole blood, urine and stomach contents; Forensic Sci Int 1990; 47(2): 113-121

Ammon, E; Schafer, C; Hofmann, U; Klotz, U; Disposition and first-pass metabolism of ethanol in humans: is it gastric or hepatic and does it depend on gender; Clin Pharmacol Ther 1996; 59(5): 503-513

Armbruster, DA; Schwarzhoff, RH; Hubster, EC; Liserio, MK; Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs of abuse screening; Clin Chem 1993 (39)10: 2137-2146

Baselt, RC; Cravey, RH; Disposition of toxic drugs and chemicals in man; 4th edition 1995; Chemical Toxicology Institute; Foster City; California; USA

Batzer, W; Ditzler, T; Brown, C; LSD use and flashbacks in alcoholic patients; J Addict Dis 1999; 18(2): 57-63

Berger, D; Berger, M; von Wartburg, JP; Structural studies of human-liver alcohol-dehydrogenase isoenzymes; Eur J Biochem 1974 (50): 215-225

Blum, LM; Carenzo, EF; Rieders, F; Determination of lysergic acid diethylamide (LSD) in urine by instrumental high-performance thin-layer chromatography; J Anal Toxicol 1990; 14(5): 285-287

Bönnichsen, R; Dimberg, R; Maehly, A; Åqvist, S; Die Alkoholverbrennung bei Alkoholikern und bei übrigen Versuchspersonen; Blutalkohol 1968 (5): 301-317

Bogusz, MJ; Maier, RD; Kruger, KD; Kohls, U; Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry; J Anal Toxicol 1998; 22(7): 549-58

Bratzke, H; Klug, E; Violent crimes and LSD poisoning; Beitr Gerichtl Med 1985; (43): 179-186

Brettel, HF; Rupp, W; Schleyerbach, R; Die Rolle der Leber beim sogenannten Resorptionsdefizit. Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen; Z Rechtsmedizin 1977; (79): 217-223

Bron, B; Psychopathologisches Erscheinungsbild und klinische Bedeutung des Horror-Trips; Suchtgefahren 1979; (25): 167-176

Bron, B; Fröscher, W; Gehlen, W; Differentialdiagnostische und syndromgenetische Probleme und Aspekte drogeninduzierter Psychosen bei Jugendlichen; Fortschr Neurol Psyc 1976; (44): 673-682

Burris, KD; Breeding, M; Sanders-Bush, E; (+)Lysergic acid diethylamide, but not its nonhallucinogenic congeners, is a potent serotonin 5HT_{1C} receptor agonist; J Pharmacol Exp Ther 1991; 258(3): 891-896

Cai, J; Henion, J; Eludication of LSD in vitro metabolism by liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry; J Anal Toxicol 1996; (20): 27-37

Cai, J; Henion, J; On-line immunoaffinity extraction-coupled column capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry: trace analysis of LSD analogs and metabolites in human urine; Anal Chem 1996; (68): 72-78

Caplan, YH; Levine, B; The analysis of ethanol in serum, blood, and urine: A comparison of the TD_X REA Ethanol Assay with gas chromatography; J Anal Toxicol 1986; (10): 49-52

Cassells, NP; Craston, DH; Hand, CW; Baldwin, D; Development and validation of a nonisotopic immunoassay for the detection of LSD in human urine; J Anal Toxicol 1996; 20(6): 409-415

Clarkson, ED; Lesser, D; Paul, BD; Effective GC-MS procedure for detecting iso-LSD in urine after base-catalyzed conversion to LSD; Clin Chem 1998; 44(2): 287-292

Cody, JT; Valtier, S; Immunoassay analysis of lysergic acid diethylamide; J Anal Toxicol 1997; 21(6): 459-464

Crabb, DW; Bosron, WF; Li, TK; Ethanol metabolism; Pharmacol Ther 1987;34(1): 59-73

De Kanel, J; Vickery, WE; Waldner, B; Monahan, RM; Diamond, FX; Automated extraction of lysergic acid diethylamide (LSD) and N-demethyl-LSD from blood, serum, plasma, and urine samples using the Zymark Rapid Trace with LC/MS/MS confirmation; J Forensic Sci 1998; 43(3): 622-625

De Zeeuw , RA; Franke, JP; Degel, F; Machbert, G; Schütz, H; Wijsbeek, J; Thin-Layer chromatographic R_F -Values of toxicologically relevant substances on standardized systems; Report XVII of the DFG Commission for Clinical-toxicological Analysis/ Special Issue of the TIAFT Bulletin; 1992; VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim

Ditt, J; Erbrechen und Blutalkoholkurve; Blutalkohol 1963; (2): 68-72

Ditt, J; Schulze, G; Blutverlust und Blutalkoholkonzentration; Blutalkohol 1961; (1): 183-187

Doherty, L; Optimizing detection of LSD: the HP 6890/5973 GC/MSD system; Hewlett Packard Company 1997; Palo Alto; CA; USA

Estler, CJ (Herausgeber); Pharmakologie und Toxikologie: Lehrbuch für Mediziner, Veterinärmediziner, Pharmazeuten und Naturwissenschaftler; 4. neubearbeitete Auflage 1995; Schattauer Verlag; Stuttgart; New York

Etzler, K, Joswig, EH; Mallach, HJ; Über den Nahrungseinfluß auf den sinkenden Blutalkoholspiegel; Arch Kriminol 1968; (142): 142-148

Francis, JM; Craston, DH; Development of a stand-alone affinity clean-up for lysergic acid diethylamide in urine; Analyst 1996; 121(2): 177-182

Francom, P; Andrenyak, D; Lim, HK; Bridges, RR; Foltz, RL; Jones, RT; Determination of LSD in urine by capillary column gas chromatography and electron impact mass spectrometry; J Anal Toxicol 1988; 12(1): 1-8

Fraser, AG; Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs; Clin Pharmacokinet 1997 Aug; 33(2): 79-90

Freudenberg, K; Mallach, HJ; Bemerkungen über die Konstanten c_0 und r von Widmark; Blutalkohol 1966; (3): 372-380

Frost, M; Kohler, H; Blaschke, G; Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection; J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 693(2): 313-9

Fujimiya, T; Yamaoka, K; Fukui, Y; Parallel first-order and Michaelis-Menten elimination kinetics of ethanol. Respective role of alcohol dehydrogenase (ADH), non-ADH and first-order pathways; J Pharmacol Exp Ther 1989; 249(1): 311-317

Fysh, RR; Oon, MC; Robinson, KN; Smith, RN; White, PC; Whitehouse, MJ; A fatal poisoning with LSD; Forensic Sci Int 1985; 28(2): 109-113

Galanos, DS; Kapoulas, VM; The paper chromatographic identification of compounds using two reference compounds; J Chromatogr 1964 (13): 128-138

Geiss, F; Fundamentals of thin layer chromatography; 1, Auflage 1987; Dr Alfred Huethig Verlag; Heidelberg; Basel; New York

Geschwinde, T; Rauschdrogen- Marktformen und Wirkungsweisen; 1. Auflage 1985; Springer Verlag; Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo

Gibitz, J; Schütz, H; Bestimmung von Ethanol im Serum; Mitteilung XX der Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft für klinisch-toxikologische Analytik 1993; VCH-Verlagsgesellschaft; Weinheim

Glickman, L; LSD, alcohol, and the courts; Am J Psychiatry 1970; 126(8): 1179-1181

Halpern, JH; Pope, HG Jr; Do hallucinogens cause residual neuropsychological toxicity; Drug Alcohol Depend 1999; 53(3): 247-56

Harzer, K; Nachweis von LSD in Körperflüssigkeiten mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; J Chromatogr 1982; (249): 205-208

Henderson, DR; Friedman, SB; Harris, JD; Manning, WB; Zoccoli, MA; CEDIATM, a new homogeneous immunoassay system; Clin Chem 1986; (32): 1637-1641

Hesse, E; Rausch-, Schlaf- und Genußgifte; 3. Auflage 1966; Enke-Verlag; Stuttgart

Hofmann, A; LSD -mein Sorgenkind; 6. Auflage 1997; Deutscher Taschenbuchverlag; München

Holtorf, J; Hinkel, GK; Alkoholembryopathie; Z Ges Inn Med 1981; (16): 587-591

Hoey, LD; Xenakis, TG; Detection and Quantitation of LSD extracted from urine specimens; Hewlett Packard Company 1991; USA

Hübschmann, H-J; Handbuch der GC/MS; 1. Auflage 1996; VCH-Verlagsgesellschaft; Weinheim; New York; Basel; Camebridge; Tokyo

Jacobsen, E; The metabolism of ethyl alcohol; Pharmacol Rev 1952; (4): 107-135

Janiger, O ; Dobkin de Rios, M ; LSD and creativity; J Psychoactive Drugs 1989; (1): 129-134

Jones, AW; The drunkest drinking driver in Sweden: blood alcohol concentration 0.545% w/v; J Stud Alcohol 1999; 60(3): 400-406

Jork, H; Funk, W; Fischer, W; Wimmer, H; Dünnschichtchromatographie-Reagenzien und Nachweismethoden; Band 1; 1. Auflage 1989; VHC Verlagsgesellschaft; Weinheim

Jortani, SA; Poklis, A; EMIT[®]ETS[®] Plus Ethyl Alcohol Assay for the determination of ethanol in human serum and urine; J Anal Toxicol 1992; (16): 368-371

Jortani, SA; Poklis, A; Evaluation of the Adx[™] REA[®] Assay for determination of ethanol in serum and urine; J Anal Toxicol 1993; (17): 307-309

Keller, M; A historical overview of alcohol and alcoholism; Cancer Res 1979; 39(7/2) : 2822-2829

Klamt, RR; Homicide and LSD; JAMA 1973; 224(2): 246

Klepfisz, A; Racy, J; Homicide and LSD; JAMA 1973; 223(4): 429-430

Klinger, W; Alkohol- und Arzneimittelbiotransformation; Z Ges Inn Med 1981; (16): 543-547

Klug, E; Schmidt, G; 2-Säulen-Headspace-GC-Analyse, eine neue Variante zur Blutalkoholbestimmung; Blutalkohol 1981; (18): 237-241

Kohlenberg-Müller, K; Bitsch, I; New methods of pharmacokinetic evaluation of alcohol and its metabolites in female and male probands; Blutalkohol 1990; (1): 40-48

Krauland, W; Mallach, HJ; Mellerowicz, H; Müller, J; Über das Verhalten des Blutalkoholspiegels unter dem Einfluß körperlicher Arbeit; Blutalkohol 1965; (3): 63-65

Kügelgen, B; Therapie akuter Psychosen bei Drogenabhängigkeit; Neurol Psychiat 1979; (5): 80-86

Kürzinger, R; Clinically relevant aspects of ethanol metabolism; Z Gesamte Inn Med 1981; 36(16): 538-543

Kunkel, G; Allgemeines über das Halluzinogen "LSD-25"; Der Kriminalist 1971; (8): 29-31

Li, JH; Lin, LF; Genetic toxicology of abused drugs: a brief review; Mutagenesis 1998; 13(6): 557-65

Li, Z; McNally, AJ; Wang, H; Salamone, SJ; Stability study of LSD under various storage conditions; J Anal Toxicol 1998; 22(6): 520-5

Li, Z; Goc-Szkutnicka, K; McNally, AJ; Pilcher, I; Polakowski, S; Vitone, S; Wu, RS; Salamone, SJ; New synthesis and characterization of (+)-lysergic acid diethylamide (LSD) derivatives and the development of a microparticle-based immunoassay for the detection of LSD and its metabolites; Bioconjug Chem 1997; 8(6): 896-905

Lieber, CS; Decarli, LM; Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: in vitro characteristics and adaptive properties in vivo; J Biol Chem 1970; (245): 2505-2512

Lillsunde, P ;Korte, T; Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification; J Anal Toxicol 1991; 15(2): 71-81

Lim, HK; Andrenyak, D; Francom, P; Foltz, RL; Quantification of LSD and N-demethyl-LSD in urine by gas chromatography/resonance electron capture ionisation mass spectrometry; Anal Chem 1988; (60): 1420-1425

Macchia, T; Mancinelli, R; Gentili, S; Lugaresi, EC; Raponi, A; Taggi, F; Ethanol in biological fluids: headspace GC measurement; J Anal Toxicol 1995; 19(4): 241-246

Machata, G; Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung; Blutalkohol 1967; (4): 252-260

Machata, G; Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung (2. Mitteilung); Blutalkohol 1970; (7): 345-348

Mallach, HJ; Hartmann, H; Schmidt, V; Alkoholwirkung beim Menschen; 1. Auflage 1987; Georg Thieme Verlag; Stuttgart; New York

Mangini, M; Treatment of alcoholism using psychedelic drugs: a review of the program of Research; J Psychoactive Drugs 1998; 30(4): 381-418

Marek, GJ; Aghajanian, GK; LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT_{2A} receptors on interneurons in rat piriform cortex; J Pharmacol Exp Ther 1996; 278(3): 1373-1382

McCarron, MM; Walberg, CB; Baselt, RC; Confirmation of LSD intoxication by analysis of serum and urine; J Anal Toxicol 1990; 14(3): 165-167

McNally, AJ; Goc-Szkutnicka, K; Li, Z; Pilcher, I; Polakowski, S; Salamone, SJ; An online immunoassay for LSD: comparison with GC-MS and the Abuscreen RIA; J Anal Toxicol 1996; 20(6): 404-408

Mebs, D; Schmidt, K; Bratzke, H; Use of the ADH/REA method (Abbott Tdx-REA) in forensic blood alcohol determination; Blutalkohol 1996; 33(2): 71-77

Meier, PJ; Alkohol, Alkoholismus und Arzneimittel ; Schweiz Med Wochenschr 1985; 115(50): 1792-1803

v. Meyer, L; Untersuchung zum immunchemischen Nachweis von LSD auf Hitachi 911; Vortrag anlässlich des GFTCh-Workshops; 10.-11.10.1996; Frankfurt am Main

Miller, PL; Gay, GR; Ferris, KC; Anderson, S; Treatment of acute, adverse psychedelic reactions: "I've tripped and I can't get down"; J Psychoactive Drugs 1992; 24(3): 277-9

Moffat, AC; Jackson, JV; Moss, MS; Widdop, B; Clarke's isolation and identification of drugs; 2nd edition; 1986; The Pharmaceutical Press; London

Moikeha, SN; Nishimura, LT; Yamada, K; Hokama,Y; Isolation and characterization of human hepatic catalase; Int J Biochem 1972 (3): 315-321

Müller, S; Pocher, K; Alkohol und Herz; Z Ges Inn Med 1981; (16): 577-583

Musshoff, F; Daldrup, T; Gas chromatographic/mass spectrometric determination of lysergic acid diethylamide (LSD) in serum samples; Forensic Sci Int 1997; (88): 133-140

Negwer, M; Organic-chemical drugs and their synonyms; Vol. I- IV; 7th edition 1994; Akademie Verlag; Berlin

Nelson, CC; Foltz, RL; Determination of lysergic acid diethylamide (LSD) and N-demethyl-LSD in body fluids by gas chromatography/tandem mass spectrometry; Anal Chem 1992; (64): 1578-1585

Nelson, CC; Foltz, RL; Chromatographic and mass spectrometric methods for determination of lysergic acid diethylamide (LSD) and metabolites in body fluids; J Chromatogr 1992; (580): 97-109

Neumüller, OA; Römpps Chemie-Lexikon; 7. Auflage 1977 Franck'sche Verlagshandlung; Stuttgart

Nine, JS; Moraca, M; Virji, MA; Rao, KN; Serum-ethanol determination: comparison of lactate and lactate dehydrogenase interference in three enzymatic assays; J Anal Toxicol 1995; 19(3): 192-196

Oehmichen, M; Schmidt, V; Alkoholtransfer über die Muttermilch; Med Welt 1984; (35): 1543-1546

Onishi, K; Lieber, CS; Reconstitution of the microsomal oxidizing System (MEOS): qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic alcohol consumption; J Biol Chem 1977; (252): 7124-7131

Papac, DI; Foltz, RL; Measurement of lysergic acid diethylamide (LSD) in human Plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry; J Anal Toxicol 1990; (14): 189-190

Petzold, H; Alkohol und Verdauungstrakt; Z Ges Inn Med 1981; (16): 557-560

Pfleger, K; Maurer, HH; Weber, A; Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites; Part I-III; 2nd revised and enlarged edition 1992; VHC-Verlagsgesellschaft; Weinheim

Poch, GK; Klette, KL; Hallare, DA; Manglicmot, MG; Czarny, RJ; McWhorter, LK; Anderson, CJ; Detection of metabolites of lysergic acid diethylamide (LSD) in human urine specimens: 2-oxo-3-hydroxy-LSD, a prevalent metabolite of LSD; J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 724(1): 23-33

Poppe, W; Thümmeler, U; Lehmann, J; Alkohol und Schäden am zentralen und peripheren Nervensystem; Z Ges Inn Med 1981; (16): 583-587

Pribilla, O; Schultek, T; Einfluß der Serummatrix bei der gaschromatographischen Blutalkoholbestimmung; Blutalkohol 1980; (17): 248-252

Pühler, A; Regitz, M; Schmid, R (Herausgeber); Römpf Kompakt-Lexikon Biochemie und Molekularbiologie; 1. Auflage 1999; Thieme Verlag; Stuttgart; New York

Reich, P; Hepps, RB; Homicide during a psychosis induced by LSD; JAMA 1972; 219(7): 869-871

Renger, F; Alkohol und Leber; Z Ges Inn Med 1981; (16): 560-566

Ritter, D; Cortese, CM; Edwards, LC; Barr, JL; Chung, HD; Long, C; Interference with testing for lysergic acid diethylamide; Clin Chem 1997; 43(4): 635-637

Röhrich, J; Zörntlein, S; Lotz, J; Becker, J; Kern, T; Rittner, C; False-positive LSD testing in urine samples from intensive care patients; J Anal Toxicol 1998; 22(5): 393-395

Rule, GS; Henion, JD; Determination of drugs from urine by on-line immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography-mass spectrometry; J Chromatogr 1992; (582): 103-112

Schellmann, B; Reinhardt, G; Löser, L; Untersuchungen zum Verlauf der Blutalkoholkurve nach peroraler Gabe eines Fructose-Ascorbinsäuregemischs; Blutalkohol 1979; (16): 168-192

Schmidt, G; Präzision und Streuung bei der 2-Säulen-Headspace-GC-Analyse; Blutalkohol 1982; (19): 122-128

Schmidt, V; Oehmichen, M; Alkoholkinetik und Nahrungszufuhr– Experimentelle Untersuchungen mittels parenteraler Alkoholapplikation-; Blutalkohol 1984; (21): 403-421

Schmidt, V; Oehmichen, M; Beschleunigte Ethanolelimination nach Glucosezufuhr: Aktivierung des Enzymsystems oder unspezifische gastrointestinale Stimulierung?; Beitr Gerichtl Med 1986; (44): 197-202

Schmidt, K; Kaufmann, A; Röhrich, J; Kauert, G; Nachweis von LSD im Urin mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion; Vortrag anlässlich des GFTCh-Workshops; 10.-11.10.1996; Frankfurt am Main

Schneider, S; Kuffer, P; Wennig, R; Determination of lysergide (LSD) and phencyclidine in biosamples; J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 713(1): 189-200

Schneider, V; Klug, E; Betsch, J; Diffuse symptoms caused by LSD administration; Dtsch Med Wochenschr 1983; 108(42): 1617-1618

Schomburg, G; Gaschromatographie: Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik; 2. bearbeitete und erweiterte Auflage 1987; VHC Verlagsgesellschaft; Weinheim

Schuster, P; Lieb, R; Lamertz, C; Wittchen, HU; Is the use of ecstasy and hallucinogens increasing? Results from a community study; Eur Addict Res 1998;4(1-2): 75-82

Schütz, H; Alkohol im Blut: Nachweis und Bestimmung, Umwandlung, Berechnung; 1. Auflage 1983; Verlag Chemie; Weinheim; Deerfield Beach; Florida; Basel

Schütz, H; Screening von Drogen und Arzneimitteln mit Immunoassays: Ein Leitfaden für die Praxis; 3. erweiterte und überarbeitete Auflage 1999; Wissenschaftliche Verl.-Abt. Abbott GmbH; Wiesbaden

Schwerd, W (Herausgeber); Rechtsmedizin -Lehrbuch für Mediziner und Juristen; 5. neubearbeitete Auflage; Deutscher Ärzte-Verlag 1992; Köln

Shindelman, JE; Brown, JL; Motton, DD; Weingarten, PW; Vistica, CA; Crenshaw, MC; Harris, DG; Bellet, NF; Coty, WA; Khanna, PL; Sigler, GF; CEDIA[®] LSD assay for urine drug testing; J Anal Toxicol 1996; (20): 73

Shultz, J; Weiner, H; Westcott, J; Retardation of ethanol absorption by food in the stomach; J Stud Alcohol 1980; (41): 861-870

Skoog, DA; Leary, JJ; Instrumentelle Analytik -Grundlagen, Geräte, Anwendungen;
4th Edition 1996; Springer Verlag; Berlin; Heidelberg; New York

Stettler, A; Alkohol: Historische Aspekte; Ther Umsch 1990; 47(5): 344-349

Stobbe, H; Alkohol und Hämatopoese; Z Ges Inn Med 1981; (16): 571-577

Sun, J; Lysergic acid diethylamide (LSD): specificity, sensitivity, and linearity of HP
5971A MSD; Hewlett Packard Company 1997; Palo Alto, CA, USA

Teichmann, W; Zastrow, R; Alkohol und Pankreas; Z Ges Inn Med 1981;
(16): 567-571

Teschke, R; Alkohol und Stoffwechsel; Internist 1985; (26): 436-440

Trott, RJ; Diminished responsibility and the drug scene; Br J Addict 1992;
87(2): 189-192

Uges, DRA; Orientierende Angaben zu therapeutischen und toxischen Konzentrationen
von Arzneimitteln und Giften im Blut, Serum oder Urin; Mitteilung XV der
Senatskommission für klinisch- toxikologische Analytik 1990; VHC-
Verlagsgesellschaft; Weinheim

Unger, KK (Herausgeber); Handbuch der HPLC- Teil 1 Leitfaden für Anfänger und
Praktiker; 1. Auflage 1989; GIT Verlag; Darmstadt

Verstraete, AG; Steyaert, S; Evaluation of the diagnostic performance of the
Boehringer Mannheim CEDIA LSD assay; J Anal Toxicol 1998; 22(7): 601-4

Verstraete, AG; Van de Velde, EJ; 2-oxo-3-hydroxy-LSD: an important LSD
metabolite; Acta Clin Belg Suppl 1999; (1): 94-96

Vollenweider, FX; Advances and pathophysiological models of hallucinogenic drug actions in humans: a preamble to schizophrenia research; Pharmacopsychiatry 1998; (31)Suppl 2: 92-103

Wanke, K; Drogen und Alkohol -Ihre Bedeutung für die psychische Entwicklung bei Jugendlichen; Z Allg Med 1989; (65): 93-97

Watkins, CJ; Newberry, NR; Multiple 5-HT receptors in the guinea-pig superior cervical ganglion; Br J Pharmacol 1996; 117(1): 21-28

Webb, E; Ashton, CH; Kelly, P; Kamali, F; Alcohol and drug use in UK university students; Lancet 1996; 348(9032): 922-925

Webb, KS; Baker, PB; Cassells, NP; Francis, JM; Johnston, DE; Lancaster, SL; Minty, PS; Reed, GD; White, SA; The analysis of lysergide (LSD): the development of novel enzyme immunoassay and immunoaffinity extraction procedures together with an HPLC-MS confirmation procedure; J Forensic Sci 1996; 41(6): 938-946

Weller, RA; Preskorn, SH; Psychotropic drugs and alcohol: pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions; Psychosomatics 1984; 25(4): 301-303

White, SA; Kidd, AS; Webb, KS; The determination of lysergide (LSD) in urine by high-performance liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (IDMS); J Forensic Sci 1999; 44(2): 375-379

Wilkinson, PK; Pharmacokinetics of ethanol: a review; Alcohol Clin Exp Res 1980; 4(1): 6-21

Williams, LN; L.S.D. and manslaughter; Lancet 1969; 2(7615): 332

Winek, CL; Wahba, WW; A response to "Serum-ethanol determination: comparison of lactate and lactate dehydrogenase interference in three enzymatic assays"; J Anal Toxicol 1996; 20(3): 211-212

Winek, T; Winek, CL; Wahba, WW; The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration; Forensic Sci Int 1996; 78(3): 179-185

Wölfel, S; Erdmann, F; Schütz, H; Weiler, G; Kritische, vergleichende Untersuchung zum Screening von Amphetaminderivaten und LSD; Vortrag anlässlich der 7. Frühjahrstagung –Region Nord- der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin; 5.-6.6.1998; Bonn; Deutschland

Wölfel, S; Erdmann, F; Schütz, H; Weiler, G; Praktische Bedeutung der immunchemischen Screeningmethoden beim LSD-Nachweis; Postervortrag anlässlich des 29. wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie; 8.-11.10.1998; Jever; Deutschland

Wu, AHB; Feng, YJ; Pajor, A; Gornet, TG; Wong, SS; Forte, E; Brown, J; Detection and interpretation of lysergic acid diethylamide results by immunoassay screening of urine in various testing groups; J Anal Toxicol 1997; 21(3): 181-184

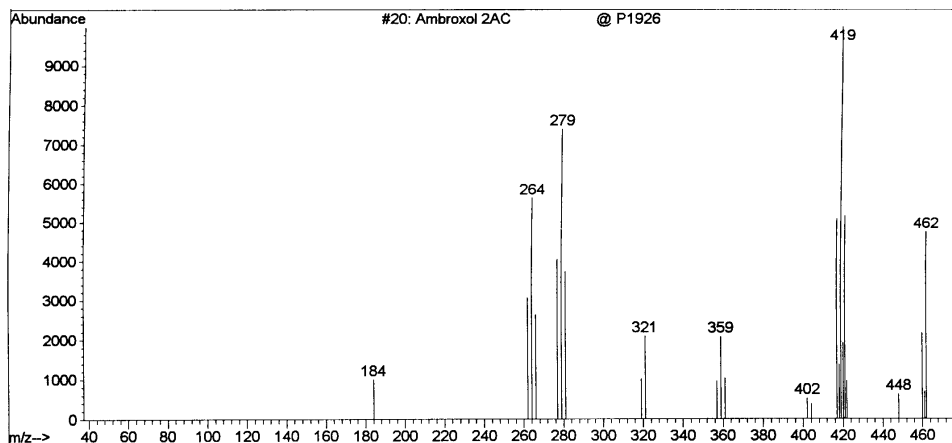
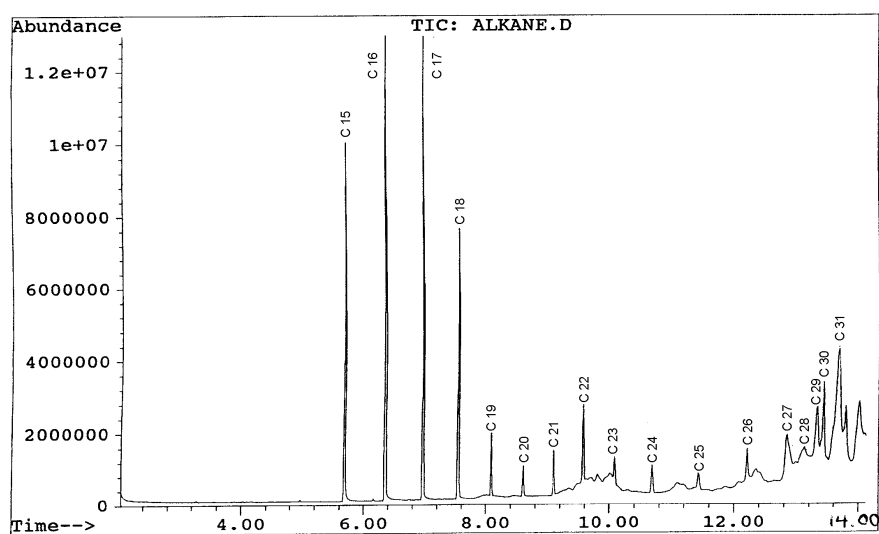
Young, SJ; Longstaffe, S; Tenenbein, M; Inhalant abuse and the abuse of other drugs; Am J Drug Alcohol Abuse 1999; 25(2): 371-375

7 Anhang

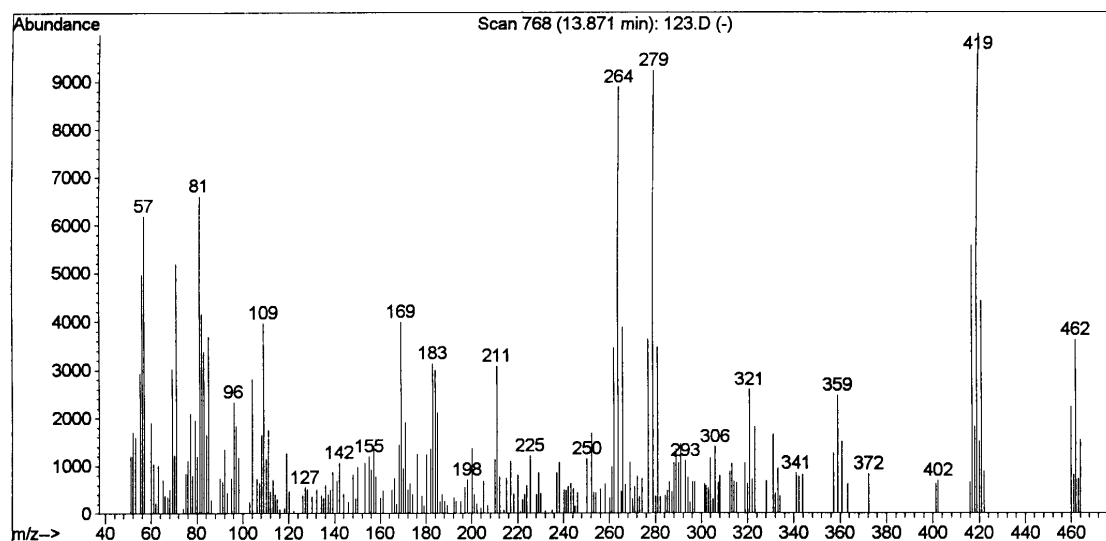
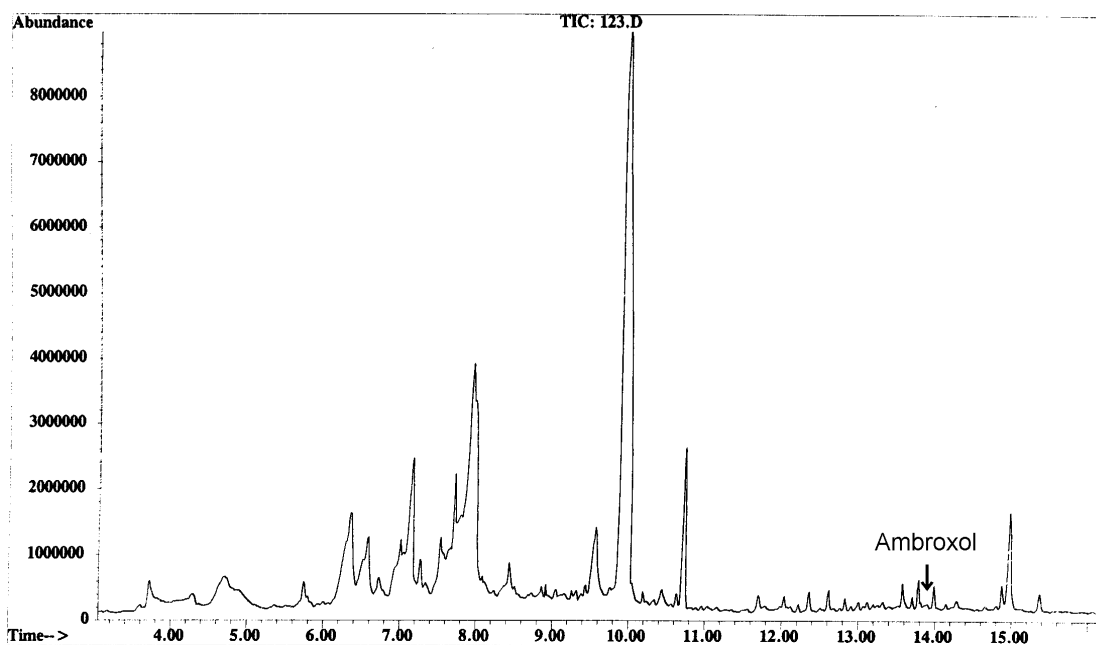
7.1 Abbildungen

Nachfolgend sind die Chromatogramme sowie das jeweilige Massenspektrum des Peaks von Interesse der bei dem Vergleich von CEDIA[®]-Methode und EMIT[®]-Methode untersuchten Proben (Nr.11, Nr. 15, Nr. 16, Nr. 17, Nr. 18, Nr. 21). Die Proben zeigten bei beiden Methoden einen Wert an und enthielten chromatographisch Ambroxol. Nachgewiesen wurde 2-fach acetyliertes Ambroxol mit einem Retentionsindex von 3165. Zum Vergleich ist außerdem zunächst ein Alkane-Chromatogramm zur Bestimmung der Retentionsindices nach Kovats sowie das Massenspektrum von Ambroxol aus der Bibliothek dargestellt.

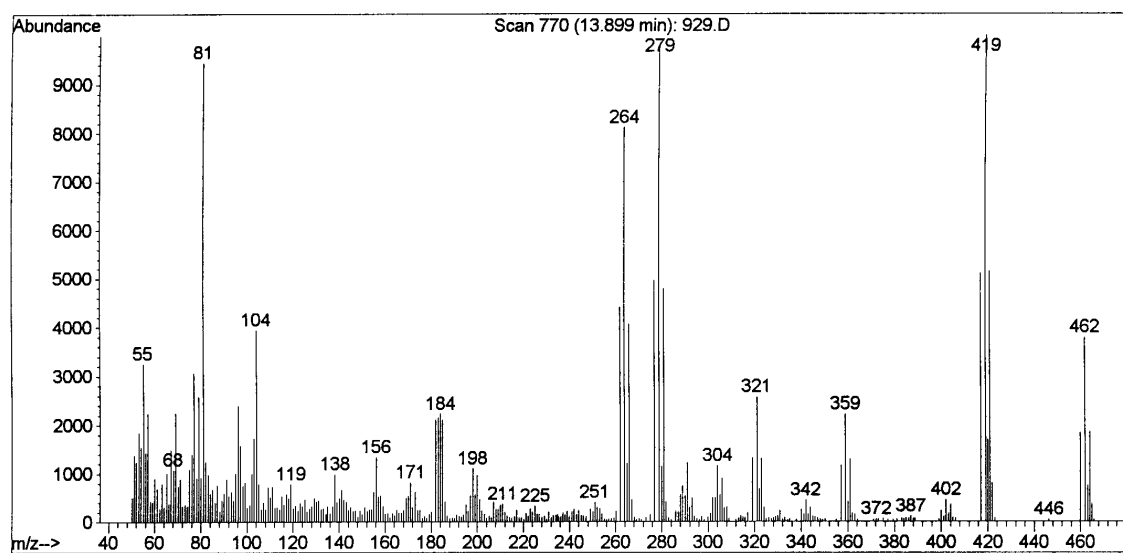
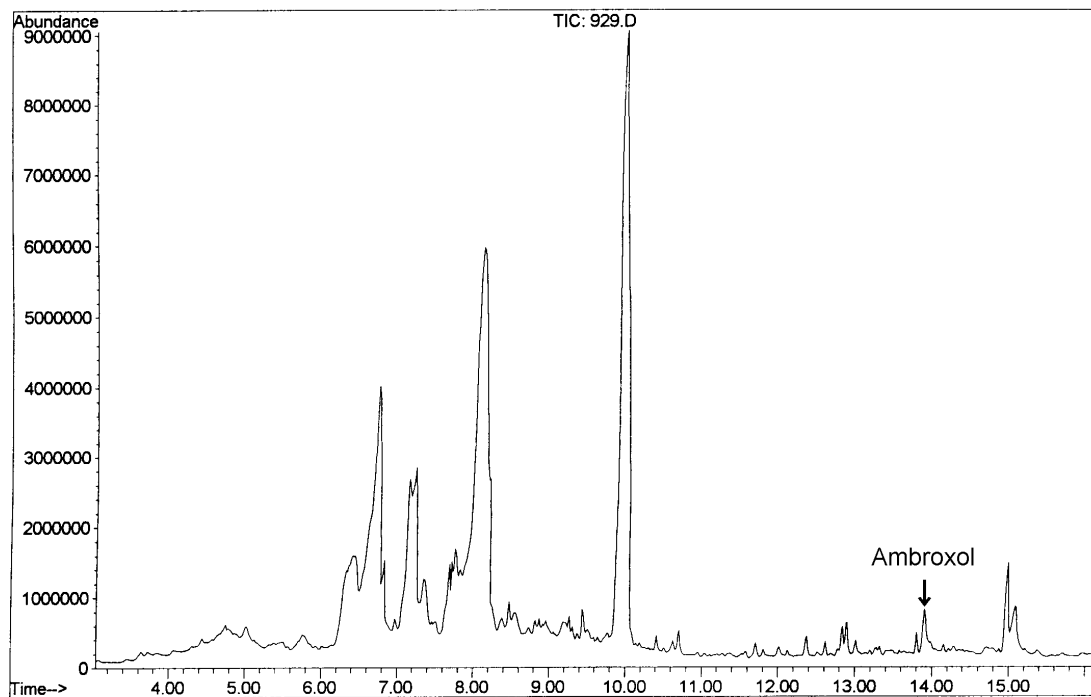
```
File       : C:\HPCHEM\1\DATA\ALKANE.D
Operator   : woelfel
Acquired    : 15 Nov 97  2:44 pm using AcqMethod BIBLIO
Instrument   : GC/MS Ins
Sample Name : Alkane in Hexane C 15 - 28
Misc Info  : scan
Vial Number: 1
```



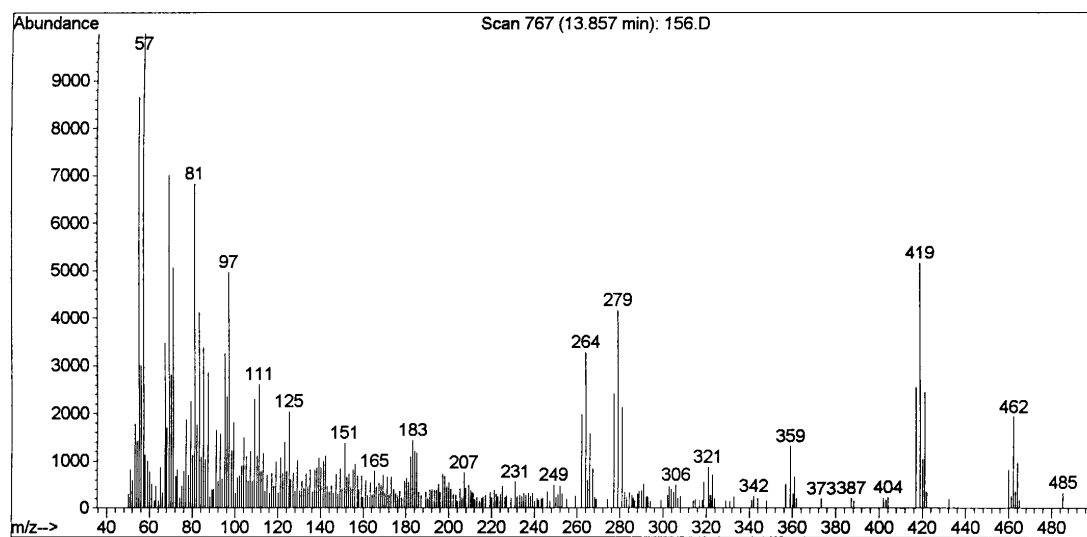
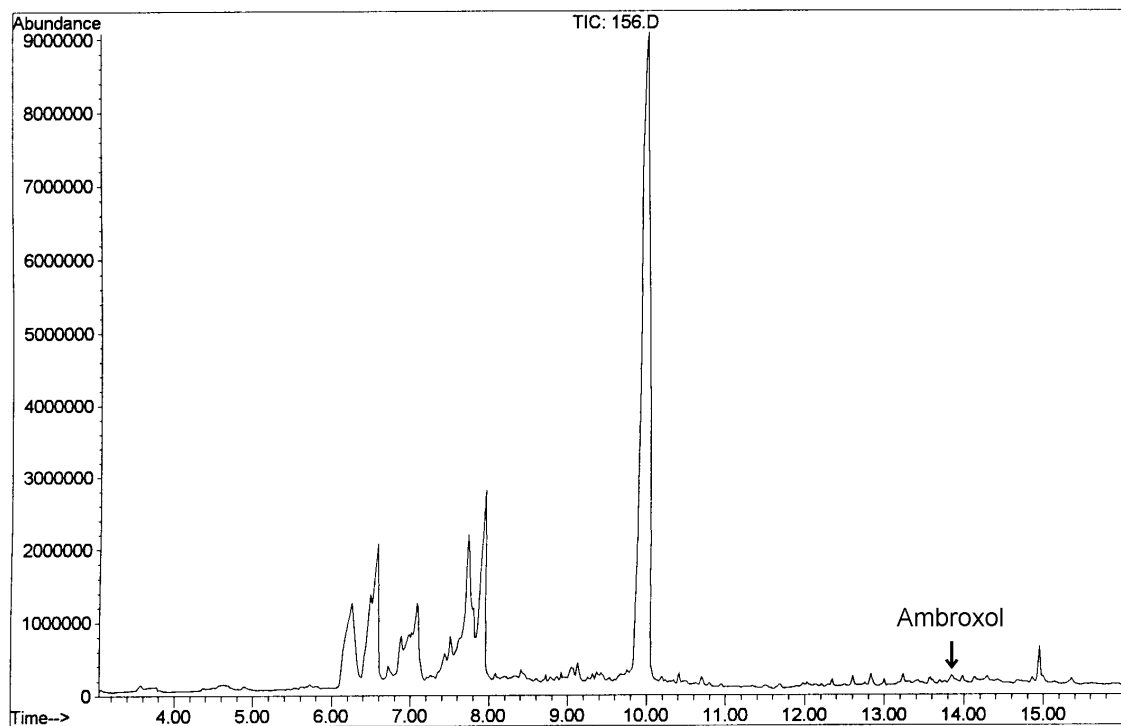
File : C:\HPCHEM\1\DATA\261197\123.D
Operator :
Acquired : 26 Nov 97 1:53 pm using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70135123
Misc Info :
Vial Number: 15



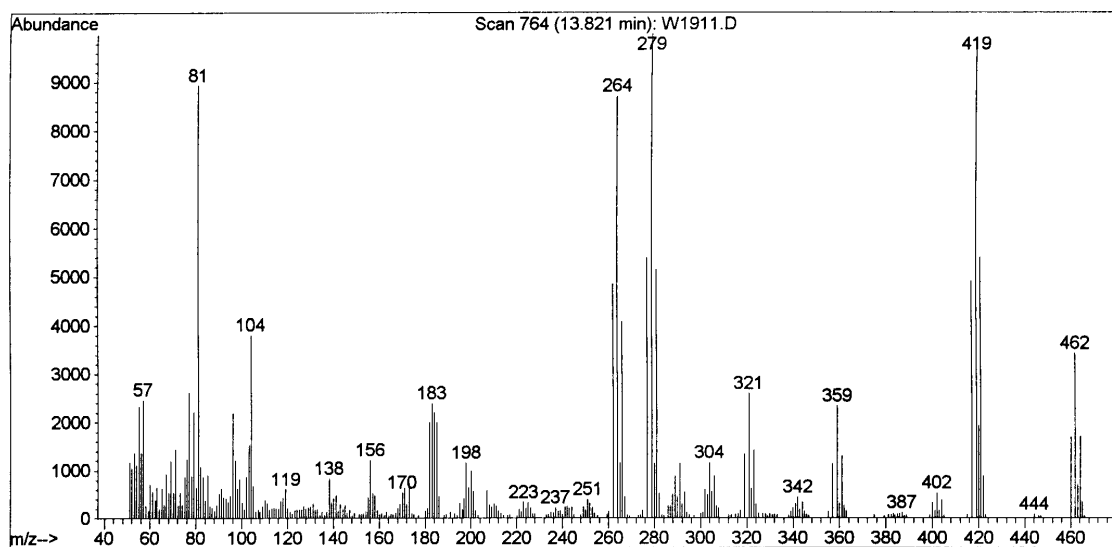
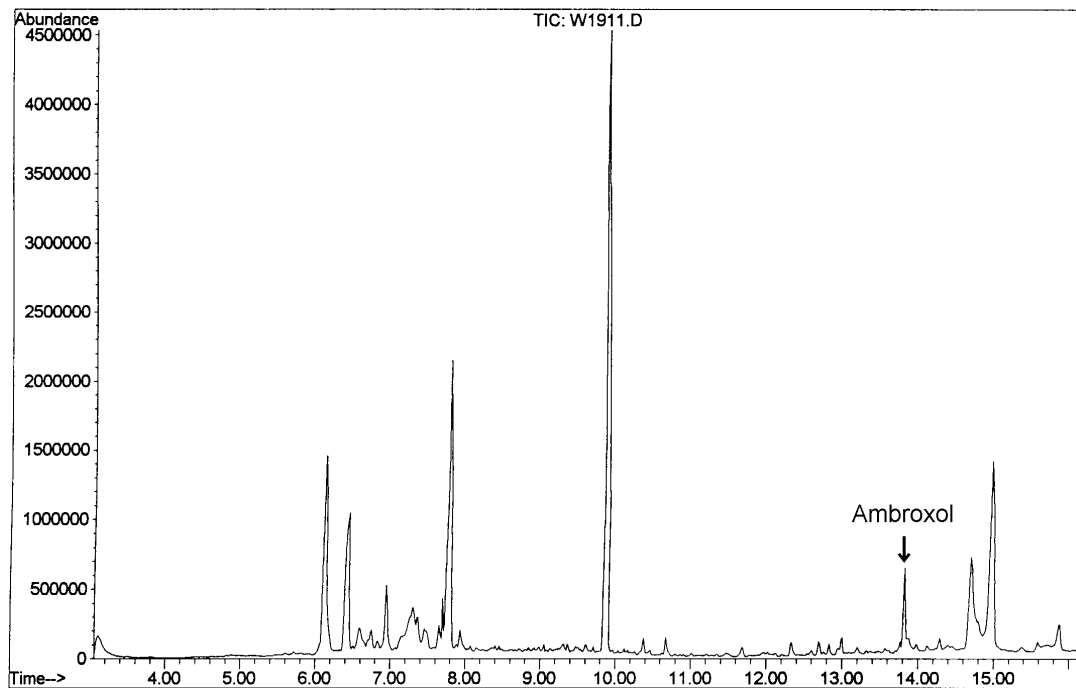
File : C:\HPCHEM\1\DATA\261197\929.D
Operator :
Acquired : 27 Nov 97 10:02 am using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70138929
Misc Info :
Vial Number: 12



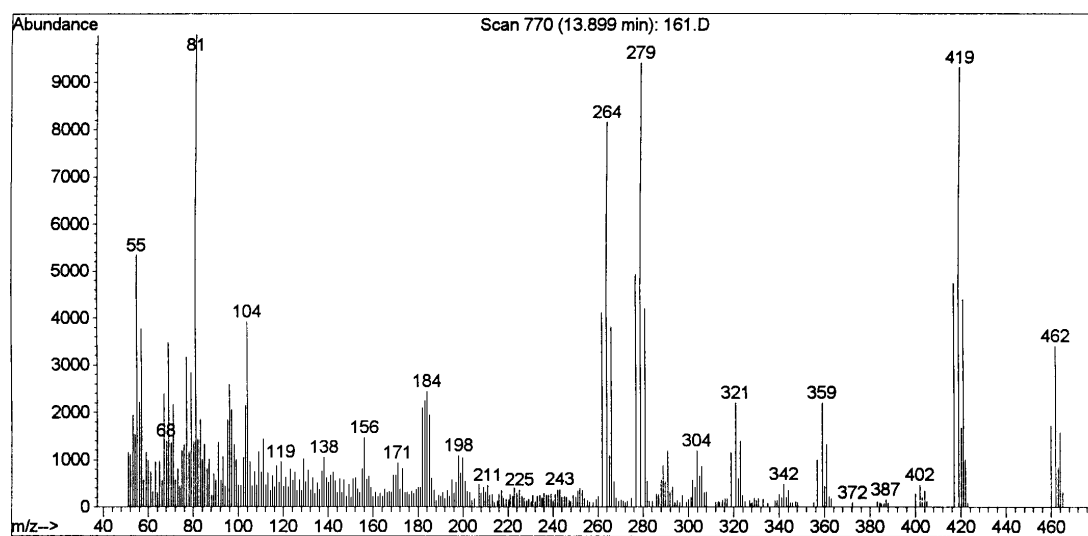
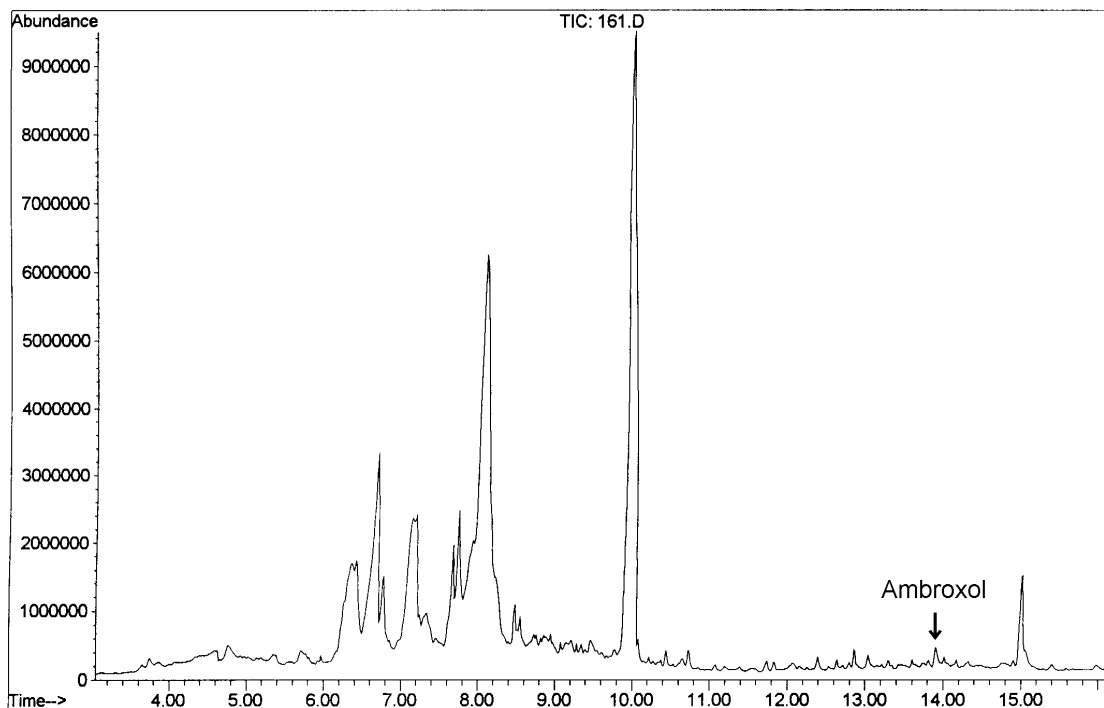
File : C:\HPCHEM\1\DATA\261197\156.D
Operator :
Acquired : 27 Nov 97 10:24 am using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70139156
Misc Info :
Vial Number: 13



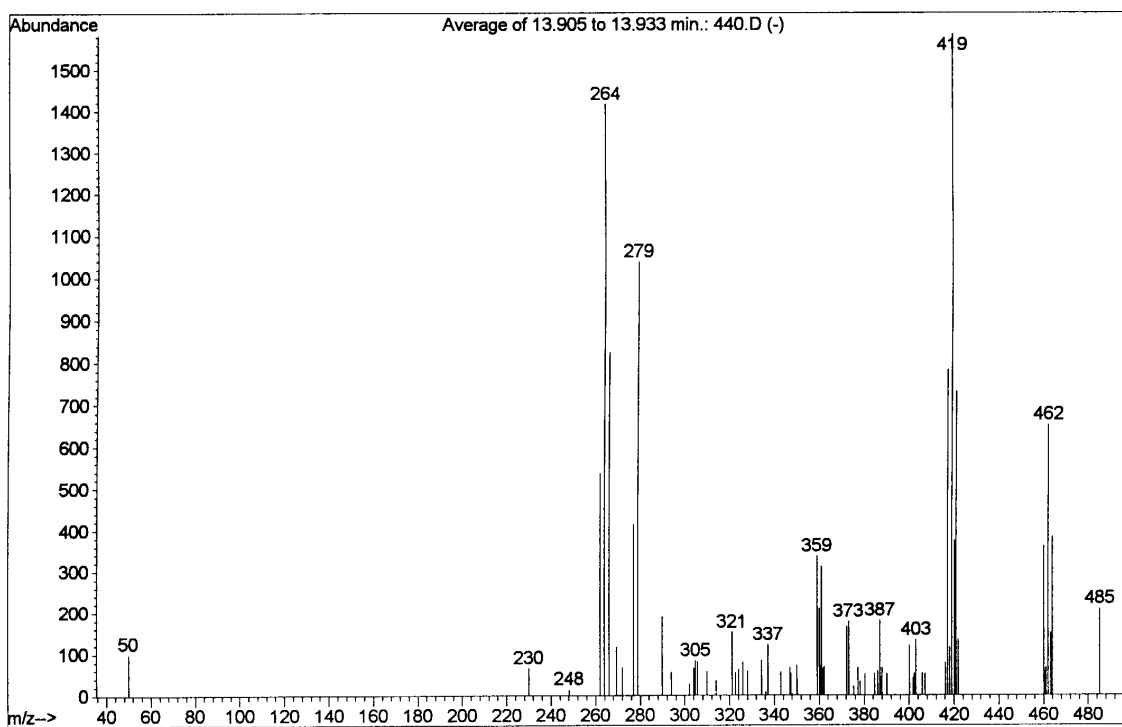
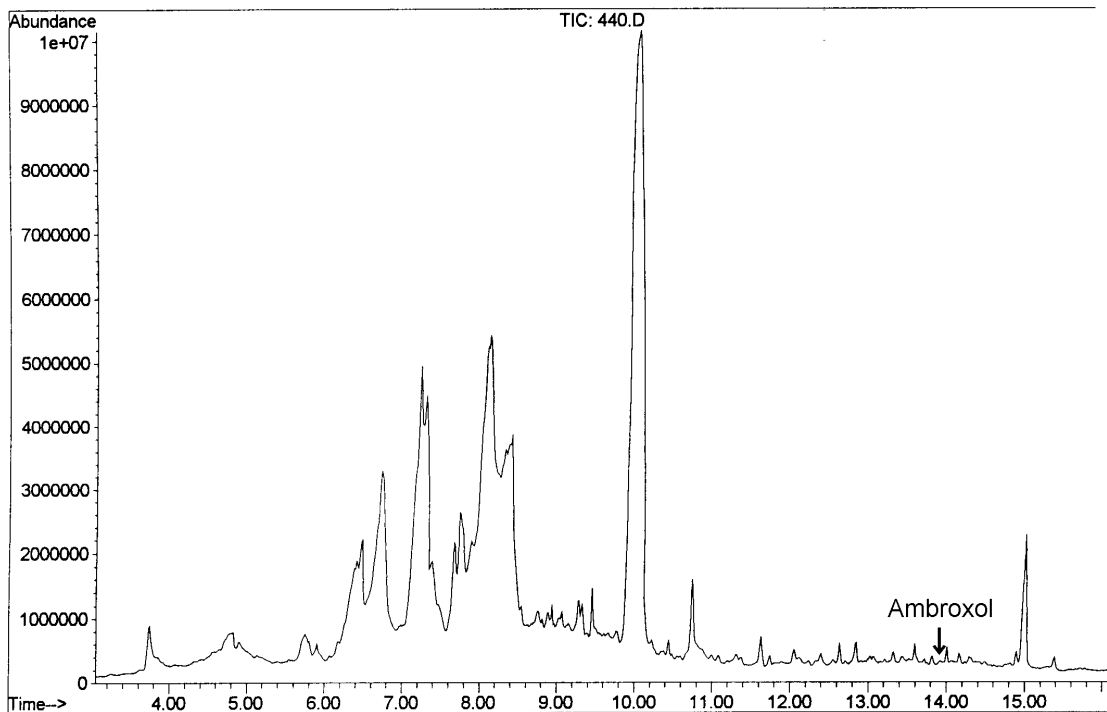
File : C:\HPCHEM\1\DATA\W1911.D
Operator : wölfel
Acquired : 19 Nov 97 11:23 am using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70138486
Misc Info : scan
Vial Number: 2



File : C:\HPCHEM\1\DATA\271197\161.D
Operator : woelfel
Acquired : 27 Nov 97 2:23 pm using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70139161
Misc Info :
Vial Number: 14



File : C:\HPCHEM\1\DATA\271197\440.D
Operator : woelfel
Acquired : 27 Nov 97 2:44 pm using AcqMethod ALLGEM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: 70138440
Misc Info :
Vial Number: 15



7.2 Abkürzungen

ACU	Affinity Clean-Up
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
BAK	Blutalkoholkonzentration
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CE	Capillary Electrophoresis
CEDIA	Cloned Enzyme Donor Immuno Assay
EIA	Enzyme Immuno Assay
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
FD	Fluoreszenzdetektor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC/MS/MS	Gaschromatographie/ Tandem-Massenspektrometrie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IAE	Immuno Affinity Extraction
KIMS	Kinetic Interaction of Microparticles in Solution
K_M	Michaelis-Menten Konstante
LAMPA	Lysergic Acid Methylpropylamid
LC	Liquid Chromatography
LIF	Laser Induced Fluorescence
LLE	Liquid- Liquid-Extraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LSD	Lysergsäurediethylamid
MEOS	Microsomal Ethanol Oxidizing System
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	Mono(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
PHPD	Post Hallucinogenic Perceptual Disorder
REA	Radiative Energy Attenuation
RIA	Radioimmunoassay

RP HPLC	Reversed Phase HPLC
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction
TMS	Trimethylsilyl
VK	Variationskoeffizient
$X_{\max}$	Maximalwert
$X_{\min}$	Minimalwert

LEBENS LAUF

Silke Wölfel, geborene Petri, geboren am 2. Oktober 1973 in Reutlingen als Tochter von Ernst-Jürgen Petri und Margret Petri

1980 – 1993 Schulausbildung in Koblenz, Eschweiler und Flensburg

Juni 1993 Abitur

1996 Heirat

1994 – 2000 Studium der Humanmedizin:

Vorklinischer und klinischer Studienabschnitt an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Praktika:

Krankenhaus Koblenz, Abt. Orthopädie

Krankenhaus Hamburg, Abt. Dermatologie

Krankenhaus Hamburg, Abt. Innere Medizin

Krankenhaus Leipzig, Abt. Innere Medizin

Fritzlar, Allgemeinmedizin

Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld in den Bereichen Allgemein- und Unfallchirurgie, Innere Medizin, Urologie

Abschluß: Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

1997 – 1998 Promotionsarbeit am Institut für Rechtsmedizin bei Prof. Dr. rer. nat. Harald Schütz

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Institut für Rechtsmedizin der JLU Gießen in der Abteilung für forensische Toxikologie durchgeführt. Dem Leiter des Instituts, Herrn Professor Dr. med. Weiler danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Harald Schütz für seine freundliche Unterstützung bei der Versuchsplanung und Analyse der Ergebnisse, sein Verständnis und die konstruktive Kritik bei der Entwicklung der vorliegenden Arbeit sowie für sein offenes Ohr für alle Probleme, die im Verlauf der Arbeit aufgetreten sind, aussprechen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Freidoon Erdmann. Er hat mit seiner Erfahrung und Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit zu ihrem Gelingen beigetragen.

Allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Herrn Becker, Frau Rumpf und Frau Huhs, danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundliche Hilfe.

Meinem Mann Roman danke ich für seine große Geduld und seine liebevolle Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit!

Die Reagenzien für den CEDIA[®] DAU LSD und den ETHYL ALCOHOL Assay sowie weiteres Zubehör stellte uns freundlicherweise Boehringer Mannheim zur Verfügung. Hierfür, ebenso wie für die Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung der Mitarbeiter mein herzlicher Dank.

✓